

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年9 月25 日 (25.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/078624 A1(51) 国際特許分類:
C12N 15/09,
C12Q 1/34, 1/68, A61K 45/00, A61P 35/00, 43/00, G01N
33/15, 33/50, 33/53, 33/566(TANIYAMA, Yoshio) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つく
ば市 春日 1-7-9 武田春日ハイツ 501号 Ibaraki
(JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/03136

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒
104-0028 東京都 中央区 八重洲 2丁目 8番 7号 福岡
ビル 9階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年3 月17 日 (17.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-074180 2002 年3 月18 日 (18.03.2002) JP
特願2002-314098
2002 年10 月29 日 (29.10.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修
町四丁目 1番 1号 Osaka (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 布施 広光
(FUSE, Hiromitsu) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つく
ば市 春日 1-7-9 武田春日ハイツ 1404号
Ibaraki (JP). 柴田 早智雄 (SHIBATA, Sachio) [JP/JP];
〒305-0033 茨城県 つくば市 東荒井 19番地 17
ガーデンヒルズ津田 207号 Ibaraki (JP). 安原 吉
高 (YASUHARA, Yoshitaka) [JP/JP]; 〒567-0841 大阪
府 茨木市 桑田町 18番 6号 Osaka (JP). 谷山 佳央

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: LLPL GENE AND NOVEL USE OF ITS GENE PRODUCT

(54) 発明の名称: LLPL遺伝子およびその遺伝子産物の新規用途

(57) Abstract: It is intended to provide an LLPL gene and a novel use of its gene product. According to a screening method with the use of LLPL, preventives and/or remedies for various diseases caused by deficiency of LLPL can be efficiently screened. A nonhuman animal with hypoexpression of LLPL lacks various biological activities which would be induced by LLPL. Thus, it is usable as a model of various diseases induced by deficiency of LLPL. Therefore, the animal is useful in screening preventives and/or remedies for various symptoms caused by deficiency of LLPL (for example, diseases caused by apoptosis), clarifying causes of LLPL-associated diseases and discussing therapies therefor. Moreover, compounds which can be obtained by the above-described screening method are useful as preventives and/or remedies for diseases caused by apoptosis.

(57) 要約: 本発明はLLPL遺伝子およびその遺伝子産物の新規用途の提供を目的とする。本発明のLLPLを用いるスクリーニング方法によれば、LLPL欠損に起因する各種疾病の予防および/または治療剤を効率良くスクリーニングすることができる。また、本発明のLLPL発現不全非ヒト動物は、LLPLにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、LLPL欠損に起因する疾病のモデルとなり得る。したがって、このモデルによれば、LLPL欠損に起因する各種症状、例えばアポトーシスに起因する疾病の予防および/または治療剤のスクリーニングや、LLPL関連疾患の原因究明および治療法の検討に有用である。さらに、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物は、アポトーシスに起因する疾病の予防および/または治療剤として有用である。

WO 03/078624 A1

1

明細書

LLPL遺伝子およびその遺伝子産物の新規用途

技術分野

- 5 本発明は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ様リゾホスホリパーゼ（LCAT-like lysophospholipase、以下「LLPL」と略すことがある）の活性を変化させる化合物のスクリーニング方法、そのスクリーニング方法によって得られうる化合物またはその塩、その化合物または塩を含有する医薬、LLPL遺伝子発現不全非ヒト哺乳動物を用いるアポトーシス誘導調節薬のスクリーニング方法などに関する。
- 10

背景技術

- リポタンパク代謝にはアポタンパク [Srivastava, R. & A., Srivastava, N. (2000) Mol. Cell Biochem., 209, 131-144]、酵素、レセプター [Hiltunen, T., P. & Yla-Herttuala, S. (1998) Atherosclerosis, 137, S81-88]、脂質転送タンパク質 [Yamashita, S. ら, (2000) Atherosclerosis, 152, 271-285、Oram, J., F. & Vaughan, A., M. (2000) Curr. Opin. Lipidol., 11, 253-260] など多くの分子が関係しているが、これらのタンパク質の遺伝子型の違いや食事
- 15 の違いがもたらす個人差が動脈硬化症と密接に関連している。その中の1つである高比重リポタンパク（HDL）コレステロールは、冠動脈疾患の独立した負の危険因子として多くの疫学的研究により認められている [Barter, P., J. & Rye, K., A. (1996) Atherosclerosis, 121, 1-12]。HDLは末梢組織の過剰なコレステロールを引き抜いて肝臓へ転送する、いわゆるコレステロール逆転送系
- 20 において主要な役割を果たしている [Tall, A. ら, (2000) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 20, 1185-1188、Santamarina-Fojo, S. ら, (2000) Curr. Opin. Lipidol., 11, 267-75]。このコレステロール逆転送系の律速酵素であるレシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）は、主として肝臓で産生され [Warden, C. ら, (1989) J. Biol. Chem., 264, 21573-21581]、
- 25

血液中のHDL粒子中に存在している [Kuivenhoven, J. ら、(1997) *J. Lipid Res.*, 38, 191-205]。Pre β HDLによって引き抜かれた末梢細胞の遊離コレステロールは、LCATによってエステル化されて、細胞へのコレステロール流入が抑制されるために、結果的にコレステロール引き抜き促進作用を示し、抗動脈硬化的に働いていると考えられている [Czarnecka, H. & Yokoyama, S. (1995) *Biochemistry*, 34, 4385-92]。このヒトLCATに対してアミノ酸レベルで47%の相同性を有する酵素LLPLが、ヒトマクロファージ様細胞のcDNAライブラリーを用いたサブトラクションPCR法で発見され、その全アミノ酸配列もcDNAの解析から明らかにされている [Taniyamaら; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257: 50-56 (1999)]。

ヒトとマウスにおいては、(1) ヒトではマクロファージ様細胞で、マウスでは腹腔マクロファージでLLPLが分泌されること、(2) アミノ酸配列で88%の相同性があること、(3) リパーゼモチーフは同じAHSMG配列であること(特開平11-269199号)、(4) 個体全体におけるLLPL遺伝子の発現特異性が末梢組織にあることなど類似する点が多い。さらに、ApoE欠損マウスの動脈硬化病変部でのLLPL遺伝子の発現が確認されているので、動脈硬化病変や血漿脂質プロファイルに対する作用が考えられた。そこで、LLPLの生体内における本来の機能および作用機序について解明する目的で、LLPLを全く産生しないようなLLPL遺伝子発現不全動物のモデルを作製し、野生型と比較することでその解析を行った。その結果、LLPL/ApoE二重欠損マウスでは、ApoE欠損マウスと比べて動脈硬化病変部の進展が見られたことから、LLPLに動脈硬化抑制作用があることが分かった。しかしながら、血中のコレステロールやトリグリセライドなどの脂質組成には大きな変化は見られず、このLLPLの動脈硬化抑制活性はこれらの脂質代謝に対する作用以外の作用で主に発現していると考えられる。

近年、酸化LDLの特異的抗体を用いた血中酸化LDLの定量系の開発が行われ、心疾患のリスクが高い患者群での血中濃度が上昇し、さらに病変部位での酸化LDL陽性マクロファージ細胞数が増加しており (Ehara S et al., *Circulation*, 103, pp1955-1960, 2001)、酸化LDLによるマクロファージの泡沫化を機

序とした粥状動脈硬化病変形成が生体レベルで起きていることが強く示唆されてきた。酸化LDLはマクロファージ細胞を泡沫化させるだけではなく、血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージ細胞に対して、動脈硬化惹起性の作用を示すが、その1つとしてアポトーシスの誘導が考えられる。

- 5 最近では、動脈硬化とアポトーシスとの関連を述べた論文が多く見られる [Martinet, W. & Kockx, M. M., (2001) Curr. Opin. Lipidol., 12, 535-541, Coll
es, S. M. ら, (2001) Trends Cardiovasc Med, 11, 131-138, 岡崎俊朗, (1999)
タンパク質 核酸 酵素, 44, 1052-1058]。例えば、アポトーシス誘導分子である
p53の欠損マウスでは、ApoEとの二重欠損マウスの結果として、細胞増
殖による病巣の進展加速が報告されている [Guevaraら, (1999) Nature Med., 5
10 , 335-339]。また、病巣内のアポトーシスの分布を調べると、浸潤したマクロ
ファージが多い領域でアポトーシスが比較的良く見られることから、プラーク内
のアポトーシスは浸潤マクロファージと強く関連していることが示唆されている。
この様に、酸化LDLや炎症性細胞がアポトーシスに関与し動脈硬化の進展を
15 促進している可能性が考えられている。

- LLPL-ノックアウトマウスは高脂血症を起こす遺伝子改変マウス、例えば
アポリポプロテインE (ApoE) -ノックアウトマウスとのダブルノックアウト
マウスにおいて動脈硬化病変形成が進行することから、動脈硬化形成に対して
防御的に働くことを見出している (特願2001-152520号、特願200
20 1-311971号、特願2002-145876号およびPCT/JP02/
04876=WO02/102998)。このLLPLの抗動脈硬化作用をさらに
深く調べることで、新たなLLPLの生理活性を発見することができる。

発明の開示

- 25 本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意努力した結果、LLPLに抗
アポトーシス活性があることを見出した。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、LLPLをターゲットとしたアポ
トーシス誘導調節作用を持つ薬剤は、動脈硬化予防および/または治療薬となる可
能性に加えて、さらに、細胞保護作用やガン治療剤として有効であると考え、さ

らに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、

- (1) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、当該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のレシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ様リゾホスホリパーゼ（LLPL）活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (2) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩を用いる、上記（1）記載のスクリーニング方法、
- (3) LLPL活性を変化させる化合物またはその塩がアポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩である上記（1）または（2）記載のスクリーニング方法、
- (4) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする、当該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のレシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ様リゾホスホリパーゼ（LLPL）活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- (5) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩を含有してなる、上記（4）記載のスクリーニング用キット、
- (6) 上記（1）～（3）のいずれかに記載のスクリーニング方法または上記（4）もしくは（5）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のLLPL活性を変化させる化合物またはその塩、
- (7) 上記（6）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- (8) アポトーシス誘導調節剤である上記（7）記載の医薬、
- (9) 抗癌剤である上記（7）記載の医薬、
- (10) 神経変性疾患予防・治療剤である上記（7）記載の医薬、

- (11) 配列番号：2で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 5 (12) 配列番号：2で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチドまたはその一部を含有することを特徴とする、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- 10 (13) 上記(11)記載のスクリーニング方法または上記(12)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の発現量を変化させる化合物またはその塩、
- 15 (14) 上記(13)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- (15) アポトーシス誘導調節剤である上記(14)記載の医薬、
- (16) 抗癌剤である上記(14)記載の医薬、
- (17) 神経変性疾患予防・治療剤である上記(14)記載の医薬、
- (18) 哺乳動物に対して、上記(6)または(13)記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導調節方法、
- 20 (19) 哺乳動物に対して、上記(6)または(13)記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌の予防および/または治療方法、
- (20) アポトーシス誘導調節剤を製造するための上記(6)または(13)記載の化合物またはその塩の使用、
- 25 (21) 抗癌剤を製造するための上記(6)または(13)記載の化合物またはその塩の使用、
- (22) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、当該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれ

6

らの塩のレシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ様リゾホスホリパーゼ（LLPL）活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（23）配列番号：8で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩を用いる、上記（22）記載のスクリーニング方法、

- 5 （24）LLPL活性を変化させる化合物またはその塩がアポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩である上記（22）または（23）記載のスクリーニング方法、

- （25）配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする、当該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のレシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ様リゾホスホリパーゼ（LLPL）活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- 10

- （26）配列番号：8で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩を含有してなる、上記（25）記載のスクリーニング用キット、
- 15

- （27）上記（22）～（24）のいずれかに記載のスクリーニング方法または上記（25）もしくは（26）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のLLPL活性を変化させる化合物またはその塩、
- 20

（28）上記（27）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（29）アポトーシス誘導調節剤である上記（28）記載の医薬、

（30）抗癌剤である上記（28）記載の医薬、

（31）神経変性疾患予防・治療剤である上記（28）記載の医薬、

- 25 （32）配列番号：9で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- (33) 配列番号：9で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチドまたはその一部を含有することを特徴とする、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- (34) 上記(32)記載のスクリーニング方法または上記(33)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の発現量を変化させる化合物またはその塩、
- (35) 上記(34)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- (36) アポトーシス誘導調節剤である上記(35)記載の医薬、
- (37) 抗癌剤である上記(35)記載の医薬、
- (38) 神経変性疾患予防・治療剤である上記(35)記載の医薬、
- (39) 哺乳動物に対して、上記(27)または(34)記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導調節方法、
- (40) 哺乳動物に対して、上記(27)または(34)記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌の予防および/または治療方法、
- (41) アポトーシス誘導調節剤を製造するための上記(27)または(34)記載の化合物またはその塩の使用、
- (42) 抗癌剤を製造するための上記(27)または(34)記載の化合物またはその塩の使用、
- (43) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードする遺伝子発現不全非ヒト哺乳動物もしくはその組織またはそれらに由来する細胞を用いることを特徴とする、アポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (44) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードする遺伝子発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与することを特徴とする、上記(43)

8

記載のスクリーニング方法、

(45) 上記(43)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、アポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩、

5 (46) 上記(43)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、アポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(47) アポトーシス誘導調節剤である上記(46)記載の医薬、

(48) 抗癌剤である上記(46)記載の医薬、

(49) 神経変性疾患予防・治療剤である上記(46)記載の医薬、

10 (50) 哺乳動物に対して、上記(45)記載のアポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導調節方法、

(51) 哺乳動物に対して、上記(45)記載のアポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌の予防および／または治療方法、

15 (52) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなるアポトーシス誘導阻害剤、

20 (53) 哺乳動物に対して、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導阻害方法、

(54) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA含有してなるアポトーシス誘導阻害剤、

25 (55) 哺乳動物に対して、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導阻害方法、

(56) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア

ミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなるアポトーシス誘導促進剤、

(57) 抗癌剤である上記(56)記載の剤、

- (58) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる癌の診断剤、
- 5

(59) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを特徴とする癌の診断方法、

- 10 (60) 配列番号：9で表されるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンス・ポリヌクレオチドを含有してなるアポトーシス誘導促進剤、

(61) 抗癌剤である上記(60)記載の剤、

- (62) 配列番号：9で表されるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンス・ポリヌクレオチドを含有してなる癌の診断剤、
- 15

(63) 配列番号：9で表されるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンス・ポリヌクレオチドを用いることを特徴とする癌の診断方法、

- 20 (64) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに対する siRNA を含有してなるアポトーシス誘導促進剤、

(65) 抗癌剤である上記(64)記載の剤、

- 25 (66) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに対する siRNA を含有してなる癌の診断剤、

(67) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のア

ミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに対する s i R N A を用いることを特徴とする癌の診断方法、

- (68) 配列番号：8 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる酸性ホスホリパーゼ A₂ (a P L A₂) 増強剤 [a P L A₂ 活性増強剤]、

- (69) 哺乳動物に対して、配列番号：8 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の有効量を投与することを特徴とする酸性ホスホリパーゼ A₂ (a P L A₂) 増強方法、

- (70) 配列番号：8 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の L L P L 活性または発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなるアポトーシス誘導調節剤、

- (71) 哺乳動物に対して、配列番号：8 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の L L P L 活性または発現量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導調節方法、

- (72) アポトーシス誘導調節剤製造のための配列番号：8 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の L L P L 活性または発現量を変化させる化合物またはその塩の使用などを提供する。

25 図面の簡単な説明

図1は、マウスゲノム上の L L P L 遺伝子のエクソン・イントロン構造を示す。図中、エクソン部分は箱で、イントロン部分は実線で示した。また、制限酵素処理により取得しサブクローニングを行った5つのDNA断片を太実線で示した。

図2は、参考例3で得られたターゲティングベクターの構築図を示す。図中、Neor^rはネオマイシン耐性遺伝子を、HSV-TKは単純ヘルペスウイルススーチジンキナーゼ遺伝子を示す。

図3は、参考例4で得られたLLPLノックアウトES細胞株のサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。

図4は、サンドイッチELISA法による組換えヒトLLPL測定標準曲線を示す。

図5は、正常ヒト血清中のLLPL濃度の測定結果を示す。

図6は、マクロファージ様THP-1細胞培養上清中のヒトLLPL量の測定結果を示す。

図7は、ApoE欠損の背景でLLPLのホモ、ヘテロ、野生型のそれぞれのマウスの肝臓、腎臓、脳の組織における酸性ホスホリパーゼA₂ (aPLA₂) 活性の測定結果を示す。

図8は、ApoE欠損の背景でLLPLのホモ、ヘテロ、野生型のそれぞれのマウスの肝臓組織ライセートタンパク質についての、蛍光基質を用いた酸性ホスホリパーゼA₂活性の測定結果を示す。

図9は、ApoE欠損の背景でLLPLのホモ、ヘテロ、野生型のそれぞれのマウス由来の腹腔マクロファージのライセートタンパク質についての、蛍光基質を用いた酸性ホスホリパーゼA₂活性の測定結果を示す。

図10は、LLPL/ApoEダブル欠損マウスから調製した肝臓、腎臓および脳組織における1-*O*-アシルセラミドシンターゼ活性の測定結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

25 (本発明で用いられるタンパク質)

本発明で用いられるタンパク質は、配列番号：1または配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、LLPLと略記する）もしくはその部分ペプチドまたはその塩である。ヒトLLPLのアミノ酸配列は公知であり、例えば、特開平11-269199

号の配列番号：1で表されるアミノ酸配列などが挙げられる。また、マウスLLPLのアミノ酸配列は公知であり、例えば、特開平11-269199号の配列番号：8で表されるアミノ酸配列などが挙げられ、GenBankにAccession No. AB017494として登録されている（文献：Biochem. Biophys. Res. Commun., 5 257 (1), 50-56 (1999)）。今回、初めてLLPLがアポトーシスに関与していることが解明された。

本明細書における「LLPL活性」とは、(i) リゾホスホリパーゼ活性、(ii) PLA₂活性、(iii) アシル転移活性、およびこれらに基づくアポトーシス抑制活性や細胞の保護作用の活性をいう。また、本明細書における「アポトーシス誘導調節」とは、アポトーシスの直接的な調節（促進または阻害）あるいはアポトーシスの間接的な調節（促進または阻害）の何れであってもよい。

本発明で用いられるタンパク質は、例えば、ヒトやその他の哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞〔例えば、網膜細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、15 骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、白血球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞20 もしくは癌細胞（例、乳癌細胞株（GI-101）、結腸癌細胞株（CX-1、GI-112）、肺癌細胞株（LX-1、GI-117）、卵巢癌細胞株（GI-102）、前立腺癌細胞株など）など〕、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁頭核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、25 被殻、尾状核、脳梁、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-6

- 0, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など
 5) に由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。

本明細書において、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、比較するアミノ酸配列に対して、例えば、約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列をいう。

- 10 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。具体的には、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸
 15 配列を含有するタンパク質として、例えば、特開平11-269199号のマウス由来のタンパク質などが挙げられ、配列番号：11で表されるアミノ酸配列があげられる。

- また、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。具体的には、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のア
 20 ミノ酸配列を含有するタンパク質として、例えば、特開平11-269199号のマウス由来のタンパク質などが挙げられ、配列番号：10、12から15で表
 25 されるアミノ酸配列があげられる。

実質的に同質の活性としては、例えば、リゾホスホリパーゼ活性、アポトーシス阻害活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リゾホスホリパーゼ活性、アポトーシス阻害活性などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍

、より好ましくは約0.5～2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リゾホスホリパーゼ活性、アポトーシス阻害活性などの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができるが、後に記載するスクリーニング方法に従って
5 測定することができる。

また、本発明で用いられるタンパク質としては、(1)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個(1～5個))のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または
10 2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個(1～5個))のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(3)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個(1～5個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(4)それら
15 を組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有する本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基(—COOH)、カルボキシレート(—COO⁻)、アミド(—CONH₂)またはエステル(—COOR)の何れであってもよい。
20

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピパロイルオキシメチル基などが用いられる。
25

本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化さ

れているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- さらに、本発明で用いられるタンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、
- 5 N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で
- 10 保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質があげられる。

15 （部分ペプチド）

本発明で用いられる部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、上記した本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、上記タンパク質と実質的に同質の活性を有するものが好ましい。

- 20 部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明で用いられるタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

- また、本発明で用いられる部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））の
- 25 アミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

- さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、上記した本発明で用いられる
- 5 タンパク質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。
- 10 本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。
- 15

（タンパク質またはその塩の製造法）

- 本発明で用いられるタンパク質またはその塩は、上記したヒトやその他の哺乳
- 20 動物の細胞または組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載するタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

- 本発明で用いられるタンパク質をヒトやその他の哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトやその他の哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした
- 25 後、酸などで抽出を行ない、得られた抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチ

ドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられるタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分
5 とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。

なお、公知の合成方法、縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の（１）～（７）に記載された方法が挙げられる。

- （１）WO 00/14227号公報（国際出願番号PCT/JP99/0476
10 6）（特に、その明細書第13頁第27行～第17頁第17行参照）
- （２）EP1111047A2号公報（特に、段落[0039]～[0053]参照）
- （３）M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- （４）SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press,
15 New York (1965年)
- （５）泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- （６）矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV、2
05 (1977年)
- （７）矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成、広川書店

20 また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる
25 。

（ポリヌクレオチド）

本発明で用いられるポリヌクレオチドとしては、上記したタンパク質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであれ

ばいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明で用いられるタンパク質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（すな
5 わち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（すなわち、非コード鎖）であってもよい。

上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の公知の方法またはそれに準じた方法により、本発明で用いられるタンパク質のmRNAを定量することができる。

10 本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞または組織由来のcDNA、上記した細胞または組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞または組織より
15 全RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：9で表わされる塩基配列を含有するDNA
20 、または配列番号：2または配列番号：9で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号：1または配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性（例、アポトーシス阻害活性など）を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

25 配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

「ハイストリンジェントな条件」とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65 °C の場合が最も好ましい。

本発明で用いられる「タンパク質をコードする DNA の塩基配列の一部、または該 DNA と相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチド」とは、下記の本発明で用いられる部分ペプチドをコードする DNA を包含するだけでなく、RNA をも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、タンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド (核酸) を、アミノ酸配列が決定されたタンパク質をコードする DNA、あるいはクローン化された DNA の塩基配列情報に基づき設計、合成することができる。そうしたポリヌクレオチド (核酸) は、本発明で用いられるタンパク質遺伝子の RNA とハイブリダイズすることができ、該 RNA の合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明で用いられるタンパク質関連 RNA との相互作用を介して本発明で用いられるタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明で用いられるタンパク質関連 RNA の選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明で用いられるタンパク質関連 RNA と特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、本発明で用いられるタンパク質遺伝子の生体内および生体外での発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。本発明で用いられるタンパク質遺伝子の 5' 端ヘアピンループ、5' 端 6 ベースペア・リピート、5' 端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF 翻訳終止コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パリンドロー

ム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、本発明で用いられるタンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

5 (アンチセンス・ポリヌクレオチド)

- 目的核酸と対象領域の少なくとも一部に相補的でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、対象物と「アンチセンス」であるということが出来る。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質、核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレート化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）で

あってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいは
5 その他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は、（1）細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、（2）アンチセンス核酸の細胞透過性をより
15 高める、（3）目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、（4）もし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにするなどの方針で好ましく設計されうる。

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 など
20 到開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療に適用されたり、付加された形態で与えられることができ
25 うる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート

、コール酸など)が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明で用いられるタンパク質の生体内や生体外の遺伝子発現系あるいは翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチドは、生体内におけるLLPL又はLLPL遺伝子の機能を抑制することができるので、例えば、LLPLの機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として用いることができる。さらに、本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチドは、組織や細胞におけるLLPLをコードするDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできるので、LLPLの機能不全に関連する疾患の診断に用いることができる。

20 (部分ペプチドをコードするDNA)

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞または組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、

- (1) 配列番号：2 または配列番号：9 で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、
- 5 (2) 配列番号：2 または配列番号：9 で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイスロリレンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号：1 または配列番号：8 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質ペプチドと実質的に同質の活性（例、アポトーシス阻害活性など）を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。
- 10 配列番号：2 または配列番号：9 で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイスロリレンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2 または配列番号：9 で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

15

(DNAのクローニング)

- 本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチド（以下、本発明で用いられるタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングのための選別手段としては、（1）本発明で用いられるペプチドをコードするDNAの塩基配列の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いたPCR法による増幅、（2）本発明で用いられるタンパク質の一部あるいは全領域をコードする、放射性物質または酵素等で標識したDNA断片もしくは合成DNAと適当なベクターに組み込んだ本発明で用いられるペプチドをコードするDNAとのハイブリダイゼーションが挙げられる。ハイブリダイゼーションの方法は、
- 20
- 25 前記と同様の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、Mut anTM-super Express Km（宝酒造（株））、Mut anTM-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex 法、Kunkel 法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なう

ことができる。

クローン化された本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとして
5 のATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

(発現ベクター)

10 本発明で用いられるタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明で用いられるタンパク質をコードするDNA、例えばcDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pCR4、pCR2.1、
15 pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo
20 oなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる
25 。これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモ-

ター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

- 5 発現ベクターには、プロモーターの他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、
- 10 アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。
- 15 また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明で用いられるタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、
- 20 宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

（形質転換体）

- 25 このようにして構築された本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オ

プ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)
 , 60巻, 160 (1968)), JM103 [ヌクレック・アシッズ・リサーチ,
 (Nucleic Acids Research), 9巻, 309 (1981)], JA221 [ジ
 ャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology
 5), 120巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュ
 ラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティク
 ス (Genetics), 39巻, 440 (1954)], DH5 α [Inoue, H., Nojima,
 H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28 (1990)], DH10B [プロシーディングズ
 ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユー
 10 エスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 87巻, 4645-4649 (19
 90)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (Bacillus subtilis)
) MI114 [ジーン, 24巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナ
 ル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1
 15 984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレピシエ (Saccharomyces cere
 visiae) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-
 12, シゾサッカロマイセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC
 1913, NCYC2036, ピキア・パストリス (Pichia pastoris) などが
 20 用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、ヨトウガの幼虫
 由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの
 中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestr
 a brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウ
 25 イルスがBmNPVの場合は、カイコ由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN細
 胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL17
 11)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 21
 3-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー

(Nature) , 315 巻, 592 (1985)] 。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記)、マウス
5 L細胞, マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69 巻, 2110 (1972) やジーン (Gene)
10 , 17 巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168 巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194 巻, 182-187 (1991) 、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75 巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル. 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology) , 52 巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

25 このようにして、本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

各種宿主について適当な培地、培養条件などについては公知である (特に、WO 00/14227 号公報第24頁第24行~第26頁第8行、EP 1111047 A 2 号公報段落 [0090] ~ [0096] 参照)

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明の本発明で用いられるタンパク質を生成せしめることができる。

(形質転換体からのタンパク質の分離精製など)

- 5 上記培養物から本発明で用いるタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明で用いるタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁する。超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により本発明で用いられるタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に本発明で用いられるタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

- 15 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明で用いられるタンパク質の精製は、公知の分離精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- 25 このようにして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを

部分的に除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

このようにして生成する本発明で用いられるタンパク質またはその塩の活性は
5 特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

(抗体)

本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその
10 塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであつてもよい。

本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明で用いられるタンパク質等と略記する場合がある）に対する抗体は、本
15 発明で用いられるタンパク質等を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明で用いられるタンパク質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が
20 可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラット
25 が好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された哺乳動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することがで

きる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化した本発明で用いられるタンパク質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG(好ましくは、PEG1000~PEG6000)が10~80%程度の濃度で添加され、約20~40℃、好ましくは約30~37℃で約1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、本発明で用いられるタンパク質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明で用いられるタンパク質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))

- ）またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の
- 5 抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

- モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。
- 10

〔ポリクローナル抗体の作製〕

- 15 本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（本発明で用いられるタンパク質等の抗原）とキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明で用いられるタンパク質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。
- 20

- 哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。
- 25

また、ハプテンとキャリアのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チ

オール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、哺乳動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

以下、(1) LLPLまたはその部分ペプチド(その塩も含まれる)のLLPL活性を変化させる化合物のスクリーニング方法、(2) LLPLの機能不全または発現過多に関連する疾患の予防および/または治療剤、(3) LLPLまたはその部分ペプチドをコードするDNAまたはそれに対するアンチセンスDNAを用いるmRNAの定量方法、診断剤および診断方法、(4) LLPLまたはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、(5) LLPLまたはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および/または治療剤、(6) LLPLまたはその部分ペプチドに対する抗体を用いるタンパク質などの定量、該抗体を含有する診断薬および診断方法、(7) LLPLまたはその部分ペプチドに対する抗体を含有する医薬、(8) トランスジェニック動物、(9) ノックアウト動物などについて具体的に説明する。

25 (1) LLPL活性を変化させる化合物のスクリーニング方法

ヒトLLPLは遊離コレステロールをエステル化するLCAT活性を持たないが、in vitroでリゾホスファチジルコリンを基質として、遊離脂肪酸とグリセロホスフォリルコリンに分解するリゾホスホリパーゼ活性を示す〔Taniyamaら；バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(

Biochem. Biophys. Res. Commun.) , 257 : 50-56 (1999)] 。

炎症性サイトカインの過剰生産はまた、標的細胞上のサイトカイン特異的なレセプターに結合することによりアポトーシスを誘導する。このアポトーシスが原因となって自己免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患等の各種疾患が発症する。LLPL遺伝子産物は、このようなアポトーシス誘導を含むアポトーシス誘導やアポトーシスの阻害（抑制）活性を有する。

したがってLLPLは、LLPL活性（例えば、アポトーシス阻害活性）を変化（例えば、促進または阻害）させる化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用であり、そのような化合物は、例えばアポトーシス誘導調節剤（アポトーシス誘導促進剤またはアポトーシス誘導阻害剤）として有用であると考えられる。

本明細書における「アポトーシス誘導調節」とは、アポトーシスの直接的な調節（促進または阻害）あるいはアポトーシスの間接的な調節（促進または阻害）の何れであってもよい。

以下、本発明のスクリーニング方法について説明する。

本発明は、LLPL活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

より具体的には、本発明は、

(i) 本発明で用いられるタンパク質を産生する能力を有する細胞のLLPL活性と (ii) 本発明で用いられるタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物のLLPL活性の比較を行なうことを特徴とするLLPL活性促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明で用いるタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッ

ファー、ほう酸バッファーなどの、LLPL活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明で用いるタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで
5 形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明で用いられるタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

例えば、上記（ii）の場合におけるLLPL活性（例、リゾホスホリパーゼ
10 活性、アポトーシス阻害活性など）を、上記（i）の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明で用いられるタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

また、例えば、上記（ii）の場合におけるLLPL活性を、上記（i）の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害（または抑制）する試験化合物を本発明で用いられるタンパク質の活性を
15 阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

また、LLPL遺伝子のプロモーター下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、上記の各種細胞に発現させ、該細胞に上記試験化合物を接触させた場合におけるLLPL活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによってLLPLの発現を促進または抑制（す
20 なわち、本発明で用いられるタンパク質の活性を促進または阻害）する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。
25

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物

組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、LLPL活性（例、リゾホスホリパーゼ活性、アポトーシス阻害活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩である。

- 5 具体的には、LLPLの活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、アポトーシス誘導調節剤（特に、アポトーシス誘導阻害剤）、アポトーシスに起因する疾病（例、アルツハイマー病などの神経変性疾患、動脈硬化症、高脂血症など）に対する予防および／または治療剤などの医薬として有用である。

- 10 LLPLの活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、アポトーシス誘導調節剤（特に、アポトーシス誘導促進剤）やアポトーシスに起因する疾病（例、癌など）に対する予防および／または治療剤などの医薬、抗がん剤、なかでも、薬剤感受性増強剤として有用である。

（2）LLPLの機能不全または発現過多に関連する疾患の予防および／または治療剤

- 15 （1）LLPLまたはその部分ペプチドまたは（2）LLPLまたはその部分ペプチドをコードするDNAを、LLPLの機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

- 例えば、生体内においてLLPLが減少しているために生理作用が期待できない（LLPLの欠乏症）患者がいる場合に、（1）LLPLを該患者に投与し該タンパク質の量を補充したり、（2 a）LLPLをコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（2 b）対象となる細胞にLLPLをコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるLLPLの量を増加させ、生理作用を十分に発揮させることができる。すなわち、LLPLをコードするDNAは、LLPLの機能不全に関連する疾患（例、アルツハイマー病などの神経変性疾患、動脈硬化症、高脂血症など）の予防および／または治療剤として有用である。
- 20
- 25

LLPLまたはLLPLをコードするDNAは、例えば、アポトーシスに起因する疾病（例、癌）などの予防および／または治療に有用である。

一方、LLPL アンチセンスDNAは、例えば、アポトーシスに起因する疾

病（例、癌）などの予防および／または治療に有用である。

(3) LLPLをコードするDNAまたはそれに対するアンチセンスDNAを用いるmRNAの定量方法、診断剤および診断方法

- 5 LLPLもしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド(LLPL・DNAともいう)またはそれに対するポリヌクレオチド(LLPL・アンチセンスDNAともいう)は、プローブとして使用することにより、ヒトまたはその他の哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)における本発明で用いられるタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの定量あるいは異常(遺伝子異常)の検出
10 をすることができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤、あるいは関連遺伝子が関与する疾患(例えば、癌など)の診断剤として有用である。
- 15 LLPL・DNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomics), 第5巻, 874~879頁(1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 第8
20 6巻, 2766~2770頁(1989年))などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションによりLLPLの発現低下が検出された場合は、例えば、LLPLの機能不全に関連する疾患（例、アルツハイマー病などの神経変性疾患、動脈硬化症、高脂血症など）である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、ノーザンハイブリダイゼーションによりLLPLの発現過多が検出された場合は、例えば、LLPLの過剰発現に起因する疾患（例えば、癌など）である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

(4) LLPLまたはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法

LLPL・DNAは、プローブとして用いることにより、LLPLまたはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物の(1) 血液、(2) 特定の臓器、(3) 臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii) 形質転換体等に含まれるLLPLまたはその部分ペプチドのmRNA量を測定することによる、LLPLまたはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

LLPLまたはその部分ペプチドのmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肺、大腸など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

得られた細胞に含まれるLLPLまたはその部分ペプチドのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、TaqMan PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、公知の手段によりノザンプロットを行うことにより解析することもできる。

(ii) LLPLもしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれるLLPLまたはその部分ペプチドのmRNAを同様にして定量、解析することができる。

LLPLまたはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的

ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞に含まれるLLPLまたはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、

（i i）形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、該形質転換体に含まれるLLPLまたはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、LLPLまたはその部分ペプチドの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）LLPLまたはその部分ペプチドの発現量を増加させることにより、本発明で用いられるタンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、アポトーシス阻害活性など）を増強させる化合物、（ロ）LLPLまたはその部分ペプチドの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、LLPL等の生理活性を増強するための医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、LLPL等の生理活性を減少させるための医薬として有用である。

（5）LLPLまたはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

LLPLは上記のとおり、例えば、中枢機能など生体内で何らかの重要な役割

を果たしていると考えられる。したがって、LLPLまたはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物は、LLPLの機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

- より具体的には、LLPLまたはその部分ペプチドの発現量を減少する化合物
5 は、例えば癌などの予防および／または治療剤として有用である。

該化合物をLLPLの機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

- (6) 本発明の抗体を用いるタンパク質などの定量、本発明の抗体を含有する診
10 断薬およびそれを用いる診断方法

本発明の抗体は、LLPL等を特異的に認識することができるので、被検液中のLLPL等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどによる定量などに使用することができる。

- これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特
15 別の条件、操作等の設定は必要としない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてLLPLまたはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和5
20 4年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー (Methods in ENZYMOLOGY) Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)、
25

WO 00/14227号公報第39頁第25行～第42頁第8行、EP1111047
A2号公報段落[0115]第19頁第35行～第20頁第47行など参照」。

5 以上のように、本発明の抗体を用いることによって、LLPLまたはその塩を
感度良く定量することができる。さらに、本発明の抗体を用いる、生体内でのLLPL
またその塩の定量法を利用することにより、LLPLの機能不全に関連する
各種疾患の診断をすることができる。

例えば、LLPLの濃度低下が検出された場合は、例えば、LLPLの機能不全
に関連する疾患（例、アルツハイマー病などの神経変性疾患、動脈硬化症、高
脂血症など）である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断するこ
10 とができる。

また、LLPLの濃度増加が検出された場合は、例えば、LLPLの過剰発現
に起因する疾患（例えば、癌など）である可能性が高いまたは将来罹患する可
能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在するLLPL等の特
15 異的に検出するために使用することができる。また、LLPL等を精製するた
めに使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中のLLPL等の検出、被検細胞
内におけるLLPLの挙動の分析などのために使用することができる。

20 (7) LLPL、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体を含有する医
薬

LLPLもしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の、本発明で用
いられるタンパク質などに対する中和活性とは、該タンパク質の関与する生理活
性を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、
該タンパク質の関与する、例えば該タンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、
25 アポトーシス阻害活性など）を不活性化することができる。したがって、このよ
うな抗体は、該タンパク質の過剰発現などに起因する疾患、例えばアポトーシス
に起因する疾患（例、癌）の予防および／または治療に用いることができる。

(8) トランスジェニック動物

LLPL・DNAを用いて、LLPL等を発現するトランスジェニック動物を作出することができる。動物としては、非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する場合がある）が挙げられるが、特にマウス、ウサギなどが好適である。

- 5 LLPL・DNAを対象動物に導入するにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来のLLPL・DNAを導入する場合、これと相同性が高い動物由来のLLPL・DNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによってLLPL等を高産生するDNA
- 10 導入動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。
- 15 受精卵細胞段階におけるLLPL・DNAの導入は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てにLLPL・DNAが存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞においてLLPL等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てにLLPL等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てにLL
- 20 PL等を有する。

- LLPL・DNA導入動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配す
- 25 ることによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

LLPL・DNAが導入された動物は、LLPL等が高発現させられているので、LLPL等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

LLPL・DNA導入動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、LLPL・DNA導入マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現されたLLPLが存在する組織を分析することにより、LLPL等について分析することができる。LLPL等を
5 有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、LLPL等を単離精製することも可能である。

10

(9) ノックアウト動物

本発明は、LLPL・DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞およびLLPL・DNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 15 (1) LLPL・DNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
(2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された上記（1）記載の胚幹細胞、
(3) ネオマイシン耐性である上記（1）記載の胚幹細胞、
(4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（1）記載の胚幹細胞、
20 (5) ゲッ歯動物がマウスである上記（4）記載の胚幹細胞、
(6) LLPL・DNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
(7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子がLLPL・DNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる上記（6）記載の非ヒト哺乳動
25 物、
(8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（6）記載の非ヒト哺乳動物、
(9) ゲッ歯動物がマウスである上記（8）記載の非ヒト哺乳動物、および
(10) 上記（7）記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とするLLPL・DNAに対するプロモーター活性を促

進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

(LLPL遺伝子発現不活性哺乳動物ES細胞)

LLPL遺伝子が不活性化された哺乳動物ES細胞とは、哺乳動物ES細胞が
5 有するLLPL遺伝子に人為的に変異を加えることにより、遺伝子の発現能を抑
制するか、もしくは該遺伝子がコードしているLLPLの活性を実質的に喪失さ
せることにより、遺伝子が実質的にLLPLの発現能を有さない不活性化された
(以下、本発明のノックアウト遺伝子と称することがある)哺乳動物のES細胞
をいう。

10 本明細書中、ES細胞の材料とする哺乳動物としては、例えば、ヒト、ウシ、
ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、
ラットなどが用いられる。

また、本明細書中、非ヒト動物としては、LLPL遺伝子を有するヒト以外の
動物ならば、いかなる動物でもよいが、非ヒト哺乳動物が好ましい。非ヒト哺乳
15 動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モル
モット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。非ヒト哺乳動物のなか
でも、病態動物モデル系の作製の面から個体発生および生物サイクルが比較的短
く、また繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス(例えば純系として、C57
BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F1系統、BDF1
20 系統、B6D2F1系統、BALB/c系統、ICR系統など(なかでも好まし
くは、純系として、C57BL/6系統など、交雑系として、BDF1系統また
はICR系統など))またはラット(例えば、Wistar, SDなど)などが
特に好ましい。

LLPL遺伝子に人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的
25 手法により該遺伝子配列の一部又は全部の削除、もしくは他遺伝子の挿入または
置換があげられる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらす
か、プロモーターあるいはエクソンの機能を破壊することにより本発明のノック
アウト遺伝子を作製することができる。

LLPL遺伝子が不活性化された哺乳動物(好ましくは、非ヒト哺乳動物)E

- S細胞（以下、LLPL遺伝子不活性化ES細胞またはノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、薬剤耐性遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子またはゼオシン耐性遺伝子など、好ましくは、ネオマイシン耐性遺伝子など）、あるいはレポーター遺伝子（例えば、
- 5 lacZ（大腸菌β-ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）、GUS（β-グルクロニダーゼ遺伝子）、ルシフェラーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子、タウマリン遺伝子、GFP（Green Fluorescent Protein）遺伝子など、好ましくは、lacZなど）等を挿入することによりLLPL遺伝子のエクソンの機能を破壊するか、あるいはエクソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なmRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNAベクター（以下、ターゲティングベクターと略記する）を作製する。レポーター遺伝子を挿入してエクソンの機能を破壊する場合、該レポーター遺伝子は、LLPLプロ
- 10 モーターの制御下で発現するように挿入することが好ましい。

上記「薬剤耐性遺伝子」とは、抗生物質などの薬剤耐性に関与する遺伝子を示し、導入される遺伝子が細胞において発現したか否かを選抜するマーカーとして利用される。

- また、上記「レポーター遺伝子」とは、遺伝子発現の指標になる遺伝子群のことを示し、通常、発光反応や呈色反応を触媒する酵素の構造遺伝子が利用されることが多く、①遺伝的背景がないもの、②遺伝子発現を定量的に行える高感度の方法があるもの、③形質転換細胞への影響が少ないもの、④発現部位の局在性が示されるものなどが好ましく用いられる（植物細胞工学、第2巻、第721頁、1990）。
- また、上記の「薬剤耐性遺伝子」なども同じ目的で使用されるが、「レポーター遺伝子」は、単に導入される遺伝子が細胞において発現したかどうかだけではなく、どの組織でいつ発現したかを調べることができ、しかも定量的に発現量を正確に調べることができるものである。
- 20
- 25

さらに、ターゲティングベクターを、例えば、相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞についてLLPL遺伝子上あるいはその近傍の

DNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲティングベクター上のDNA配列とターゲティングベクター作製に使用したLLPL遺伝子以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

- 5 上記のターゲティングベクターとしては、例えば、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13など）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTB5, pC194など）、酵母由来のプラスミド（例、pSH19, pSH15など）、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはアデノウイルスベクター、バキュロウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、ヘルペスウイルス群からのウイルス、またはエプスタイン・バー・ウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。
- 10

- また、相同組換え法等によりLLPL遺伝子を不活性化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知の
- 15 EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF1
- 20 マウス（C57BL/6とDBA/2とのF1）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF1マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを遺伝的背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスと戻し交配することでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能で
- 25 ある点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚（受精後2.5日目頃の8細胞期胚が好ましい）を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また第二次セレクションは、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えばマウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られたES細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（ $1-10000\text{ U/ml}$ ）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約 37°C で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常 $0.001-0.5\%$ トリプシン/ $0.1-5\text{ mM EDTA}$ 、好ましくは約0.1%トリプシン/ 1 mM EDTA ）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合は、その培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. EvansおよびM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られるLLPL遺伝子発現不全細胞は、*in vitro*におけるLLPLの細胞生物学的検討において有用である。

また、ES細胞を保存する場合には、適当な凍結用培地（例えば、10%DMSO、10%牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) などを用いて、約 -80°C 以下で凍結保存する。

(LLPL遺伝子発現不全動物)

本発明のLLPL遺伝子発現不全非ヒト動物（以下、遺伝子発現不全非ヒト動物と称す場合がある）とは、例えば、前記のLLPL遺伝子が不活性化された哺乳動物ES細胞由来の細胞を用いて遺伝子工学的に作出されたものであり、例えば、生殖細胞および体細胞に胚形成初期に不活性化LLPL遺伝子配列を導入された非ヒト動物である。

該非ヒト動物としては、前記と同様のものが用いられる。

LLPL遺伝子をノックアウトさせるには、前記のターゲティングベクターを非ヒト動物ES細胞または非ヒト動物卵細胞に公知の方法（例えば、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、凝集法、パーティクルガン法、DEAEーデキストラン法など）によって導入し（好ましい導入法としては、ES細胞に導入する場合にはエレクトロポレーション法、卵細胞に導入する場合にはマイクロインジェクション法などがあげられる）、ターゲティングベクターの不活性化されたLLPL遺伝子配列を相同組換えにより、非ヒト動物ES細胞または非ヒト動物卵細胞の染色体上のLLPL遺伝子と入れ換えることにより行うことができる。

LLPL遺伝子がノックアウトされた細胞は、LLPL遺伝子上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲティングベクター上のDNA配列と、ターゲティングベクターに使用したマウス由来のLLPL遺伝子以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。

非ヒト動物ES細胞を用いた場合は、相同組換えにより、LLPL遺伝子が不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を胚形成の初期の適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト動物胚または胚盤胞に注入し（注入法）、またはLLPL遺伝子が不活性化されたES細胞塊を2個の8細胞期胚ではさみ込む（集合キメラ法）ことにより作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト動物の子宮に移植する。

作出された動物は正常なLLPL遺伝子座をもつ細胞と人為的に変異したLL

PL遺伝子座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異したLLPL遺伝子座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えたLLPL遺伝子座をもつ細胞で構成された個体を、

- 5 例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、LLPLヘテロ発現不全個体であり、LLPLヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔からLLPLホモ発現不全個体を得ることができる。

- 10 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法で遺伝子溶液を注入することによりターゲティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト動物を比較することにより、相同組換えによりLLPL遺伝子座に変異のあるものを選択することにより得られる。

- 15 LLPL遺伝子発現不全非ヒト動物は、該動物のmRNA量を公知の方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

このようにしてLLPL遺伝子がノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該遺伝子がノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

- 20 さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従って行うことができる。即ち、該不活化遺伝子配列の保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化遺伝子配列を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得することができる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。
- 25 ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化遺伝子配列を有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代することができる。このようにして得られた該不活化遺伝子配列を有する動物の子孫も本発明のLLPL遺伝子発現不全非ヒト動物に含まれる。

このようにLLPL遺伝子が不活性化された哺乳動物ES細胞は、LLPL遺

伝子発現不全非ヒト動物を作出する上で、非常に有用である。また、LLPL遺伝子発現不全非ヒト動物もしくはその組織またはそれらに由来する細胞は、LLPLの欠損に起因する疾病、例えば、LLPLにより誘導され得る種々の生物活性の欠失に基づく、LLPLの生物活性の不活性化に起因する疾病（例えば、セプティックショック、アポトーシスに起因する疾病など）のより良いモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明および治療法の検討に有用である。

このように、本発明のLLPL遺伝子発現不全非ヒト動物もしくはその組織またはそれらに由来する細胞を、該疾病の予防および／または治療薬のスクリーニングに用いることができる。ここで、上記組織やそれに由来する細胞の例としては、肝臓や腎臓などのホモジネートを用いて特定の活性を測定する、あるいは、腹腔マクロファージを用いて特定産物の活性や産生量を測定することでスクリーニングに用いることができる。

(10) LLPL・DNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療および／または予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

LLPL・DNA発現不全非ヒト哺乳動物は、LLPL・DNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して予防および／または治療効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、LLPL・DNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、LLPL・DNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して予防および／または治療効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられるLLPL・DNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、LLPL・DNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理

し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の予防および／または治療効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば、アポトーシスに起因する疾患に対して予防および／または治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物由来初代培養細胞に試験化合物を接触させ、アポトーシス惹起性の刺激（細胞内カルシウムイオン増加誘導剤、TNF- α あるいはFasリガンド、放射線、紫外線、熱、過酸化水素などのストレス、LPS、セラミドなど）を加え、アポトーシスの細胞生物学的あるいは生化学的マーカー（カスパーゼ活性、クロマチン凝集、染色体の断片化など）を経時的に計測する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の生存率が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上向上した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して予防および／または治療効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して予防および／または治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

25

(11) LLP L・DNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、LLP L・DNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とするLLP L・DNAに対す

るプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、LLPL・DNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記したLLPL・DNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、LLPL・DNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子がLLPL・DNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

LLPL・DNAをレポーター遺伝子で置換されたLLPL・DNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子がLLPL・DNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している場合、本来、本発明のポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド（X-gal）のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のポリペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試

験化合物から選ばれた化合物であり、LLPL・DNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

LLPL・DNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を促進し、該ポリペプチドの機能を促進することができるので、例えば、アポトーシスに起因する疾病（例、アルツハイマー病などの神経変性疾患、動脈硬化症、高脂血症など）などの医薬として有用である。

また、LLPL・DNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を阻害し、該ポリペプチドの機能を阻害することができるので、例えばアポトーシスに起因する疾病（例、癌）などの予防および／または治療剤などの医薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このように、LLPL・DNA発現不全非ヒト哺乳動物は、LLPL・DNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、LLPL・DNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防および／または治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のポリペプチドのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子導入動物）を作成すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポータ遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のポリペプチドそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

(12) 本発明で用いられるタンパク質などの活性成分の製剤化、投与方法、投与量など

LLPLまたはその部分ペプチド、LLPL活性を変化させる化合物、LLPLタンパク質をコードするポリヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、
5 LLPLまたはその部分ペプチドに対する抗体、上記のいずれかのスクリーニング方法によって得られる化合物（以下、活性成分と略記する場合がある）などを、上記予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

LLPLをコードするポリヌクレオチド又はアンチセンス・ポリヌクレオチド
10 （以下、LLPL・DNAと略記する場合がある）を上記予防および／または治療剤として使用する場合は、LLPL・DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。LLPL・DNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与でき
15 る。

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

20 本発明は、さらに

- ① 本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、
- ② 前記二重鎖RNAを含有してなる医薬、
- ③ 本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイム、
- ④ 前記リボザイムを含有してなる医薬を提供する。

25 二重鎖RNAが特異的に遺伝子の発現を抑制するRNA interference (RNAi) という現象が知られており、哺乳動物細胞においてこの現象を誘導するために用いられるRNAをsmall interfering RNA (siRNAと略記する) という。

また、自己切断反応をおこなうRNA分子であるリボザイム (Ribozyme) も遺伝子発現の抑制に関連していることが知られている。

- 上記の二重鎖RNA、リボザイムなどは、アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の発現を抑制することができ、生体内における本発明のタンパク質または本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の活性を阻害することができるので、各種癌などの予防・治療剤として使用
- 5 することができる。

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

- リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの配列
- 10 を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。

- 15 上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

- 上記活性成分（または化合物）が、製薬学的に許容できる塩を形成できるときは、そのような塩を形成していてもよい。そのような塩としては、生理学的に許
- 20 容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスル
- 25 ホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

上記活性成分（その塩も含む）は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、上記活性化合物を生理学的に認められ

る公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 5 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤など
- 10 どが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他
- 15 の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用い
- 20 られ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

- また、上記予防および／または治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレング
- 25 リコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。さらに、上記予防および／または治療剤は適当な薬剤と組み合わせて例えばLLPLが高発現している臓器や組織を特異的なターゲットとしたDDS製剤として使用することもできる。

本発明の活性成分の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、患者（60kgとして）に対して、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その

5 1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、患者（60kgとして）に対して、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

- 10 このようにして得られる製剤は、例えばヒトやその他の哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IU
- 15 PAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
20	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
25	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン

- I l e : イソロイシン
S e r : セリン
T h r : スレオニン
C y s : システイン
5 M e t : メチオニン
G l u : グルタミン酸
A s p : アスパラギン酸
L y s : リジン
A r g : アルギニン
10 H i s : ヒスチジン
P h e : フェニルアラニン
T y r : チロシン
T r p : トリプトファン
P r o : プロリン
15 A s n : アスパラギン
G l n : グルタミン

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

- 20 マウス由来LLPLのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

マウス由来LLPLをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

プライマーP94-1の塩基配列を示す。

- 25 〔配列番号：4〕

プライマーP101-4の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

プライマーSI-75の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

プライマー P 3 - t の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

プライマー P 4 - s の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

- 5 ヒト由来 L L P L のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：9〕

ヒト由来 L L P L をコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

ヒト腎臓由来 L L P L （成熟体）のアミノ酸配列を示す。

- 10 〔配列番号：11〕

マウス腎臓由来 L L P L （成熟体）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：12〕

ヒト心臓由来 L L P L （成熟体）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：13〕

- 15 ヒト腎臓由来 L L P L （成熟体）のアミノ酸配列を示す。配列番号：12 で表わされるアミノ酸配列の第 66 番目（L e u）と第 67 番目（V a l）の間に、配列番号：13 で表わされるアミノ酸配列の第 67 番目（G l u）～第 98 番目（L e u）の 32 アミノ酸残基が挿入されたものである。

〔配列番号：14〕

- 20 ヒト心臓由来 L L P L （前駆体）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕

ヒト腎臓由来 L L P L （前駆体）のアミノ酸配列を示す。

実施例

- 25 以下に、本発明を参考例および実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

参考例 1 ES 細胞の培養

ES 細胞として 129/SvEv 由来の AB2.2-Prime ES Cells (LEXICON) を

用い、Joynerらの方法 (Gene Targeting: A Practical Approach, 1993, Oxford
 University Pressあるいは、その翻訳本、ジーンターゲティング、野田哲生監
 修、(株)メディカル・サイエンス・インターナショナル) に準拠して培養を行
 った。ES細胞およびフィーダー細胞は推奨されている15% FBS, 2mM
 5 L-Glutamine, 10^{-4} M β -メルカプトエタノール, 50U/ml
 ペニシリン, 50 μ g/ml ストレプトマイシンを含むESQ DMEM培地 (ES細胞用培地) を用い、37℃、5% CO₂存在下で培養した。ES細胞は、
 10 μ g/ml マイトマイシンC (Sigma) を添加した培地で3時間培養
 することによりアレストしたフィーダー細胞層上で培養した。ES細胞の分化を
 10 できるだけ抑えるため培地交換は半量交換を基本とし、2～3日毎に継代を行っ
 た。

参考例2 マウスゲノムDNAライブラリーのスクリーニング

mLLPL cDNAを含むpCMV-SPORTプラスミド (pTB201
 15 0) をSma I 制限酵素処理によりN末端に位置するベクターのMCSからmLLPLのSma I サイトまでの約1kbpを単離した。これをプローブAとして
 129/Svj マウスゲノムライブラリーからBAC ES Mouse Hybridization library screening services (GENOME SYSTEMS) を利用して、mLLPLの全ゲノム配列を含むプラスミドmLLPL/pBelobac11を3クローン取得し
 20 た。この3クローンについて、EcoRIおよびPst I 制限酵素処理によって断片化させたDNA断片を、mLLPL ORFのほぼ全域を含むDNAプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション法により解析を行った。DNAプローブはpTB2010をテンプレートとしてセンス鎖プライマーP94-1 (配列番号: 3) およびアンチセンス鎖プライマーP101-4 (配列番号: 4) を用
 25 いてPCR法により作製した。EcoRI処理産物からは約11kbp、約7.5kbpの2つのDNA断片を、Pst I 処理産物からは約6.5kbp、約1.5kbpおよび約0.6kbpの3つのDNA断片がポジティブバンドとして得られ、合計5種類のmLLPLのポジティブバンドを検出できた。これらをそれぞれpUC118ベクターにサブクローニングを行い、プラスミドEcoRI

- (11 kbp) / pUC118、EcoRI (7.5 kbp) / pUC118、PstI (6.5 kbp) / pUC118、PstI (1.5 kbp) / pUC118、PstI (0.6 kbp) / pUC118を取得して、制限酵素マッピングおよび塩基配列を解析した。取得したクローンはmLLPLのゲノムの全領域約13 kbpをカバーするものであることが明らかになり、13 kbp mLLPLゲノム上のエクソンイントロン構造を決定した(図1)。マウスLLPLのORFは計6個のエクソンから構成されており、その活性部位と予想されているリパーゼモチーフは第5エクソン上に存在することが明らかになった。
- 5
- 10 参考例3 ターゲティングベクターpTB2224の構築
- mLLPL/pBelobac11を制限酵素処理により断片化してpUC118ベクターにサブクローニングしたプラスミドを用いて、short armおよびlong armとなるDNA断片を作製した。第6エクソンを含むHindIII/PstI断片(1.1 kbp)の両端にSalI部位を付加したものをshort armとして、第一および第二エクソンを含むEcoRI断片(11 kbp)の両端にNotI部位を付加したものをlong armとして用いるために、以下の操作を行った。
- 15
- EcoRI (7.5 kbp) / pUC118プラスミドからHindIII断片(1.3 kbp)を単離してpBluescriptIIのHindIII部位にクローニングし、MCSのインサートの5'末端がSalI部位近傍にあるクローンを選択した。このプラスミドをBamHIで切断後、T4 DNAポリメラーゼを用いて末端平滑化を行いSalIリンカーを挿入したプラスミドを取得した。これをPstIで切断後、自己環化させることによりインサートの3'端のPstI断片(0.2 kbp)を除いた。これをSalIで切断することにより両端にSalI部位の付加したshort armとなるDNA断片を取得した。
- 20
- 一方、EcoRI (11 kbp)断片をpGEM-T Easyベクター(Promega)のEcoRI部位にクローニングしたものを、NotIで切断することにより両端にNotI部位の付加したlong armとなるDNA断片を取得した。調製したshort armおよびlong armをそれぞれpPolIshort-neobPA-HSVTKベクター(Ishibashi S. ら、J. Clin. Invest. 1994 May;93(5):1885-93)のXho
- 25

I 部位およびN o t I 部位に連結することにより、目的とするターゲティングベクター p T B 2 2 2 4 を構築した (図 2)。

参考例 4 L L P L 遺伝子欠損 E S 細胞の選別

- 5 ほぼコンフルエントまで増殖した [参考例 1] で得られた E S 細胞について培地交換から 3 時間後に以下の方法でトリプシン処理を行い、E S 細胞懸濁液を調製した。E S 細胞 (T-75) を P B S / E D T A 10 m l で 3 回洗浄し、0 . 25 % トリプシン / 1 m M E D T A 溶液 (G i b c o B R L) 3 m l に懸濁させた後に、さらに D - P B S (-) 7 m l を添加して懸濁させてから、遠沈
- 10 して細胞を回収した。回収した細胞を D - P B S (-) 10 m l で 3 回洗浄した後に、D - P B S (-) 1 m l に再懸濁して E S 細胞懸濁液を調製した。 [参考例 3] で得られたターゲティングベクター DNA (約 120 μ g) p T B 2 2 2 4 を S a l I 制限酵素処理により直線化した後に、フェノールクロロホルム抽出し、エタノール沈殿を行って精製後、M i l l i - Q 水 100 μ l に溶かした
- 15 。この DNA 溶液に D - P B S (-) 0 . 9 m l を加えて 1 m l とし、先に調製した E S 細胞懸濁液に添加して 3 分間放置した。エレクトロポレーション用キュベットに 1 m l ずつ分注し、Cell Porator Electroporation System I (G i b c o B R L) を用いて E S 細胞へのエレクトロポレーションを行った (C h a r g e に設定し 330 μ F, L o w Ω を確認後、F a s t - U P でモニター値
- 20 を 300 程度まで上げる。次に、A r m に設定し M e d - D o w n でモニター値 275 になったところで、素早く T r i g g e r を押す)。エレクトロポレーション後の細胞を E S 細胞用培地 40 m l に移して穏やかに攪拌後、10 c m ディッシュ 4 枚にアレストしたフィーダー細胞上に播種した。播種してから 24 時間後に培地に G 418 (最終濃度 190 μ b / m l : G i b c o B R L) を添加
- 25 し、エレクトロポレーション後 4 日目に 1 - (2 - デオキシ - 2 - フルオロ - β - D - アラビノフラノシル) - 5 - ヨードウラシル (F I A U ; 最終濃度 100 n g / m l) を添加して L L P L 遺伝子欠損 E S 細胞の選択培養を行った。毎日培地を交換し 9 日から 11 日目に増殖したコロニーを採取して、P C R 産物のサザン解析による一次スクリーニングとゲノミックサザン解析による二次スクリー

ニングにより、目的クローンの選択を行った。得られたG418耐性株のLLPL遺伝子欠損の判定は、採取した各コロニーの一部より調製したセルライゼートをテンプレートとして、ネオマイシン耐性遺伝子上のセンス鎖プライマーS1-75（配列番号：5）とshort arm上に位置するアンチセンス鎖プライマーP3-10-t（配列番号：6）を用いたPCRを行った。このPCR産物をアガロースゲル上で電気泳動した後にHybond N+（Amersham Pharmacia Biotech）にアルカリトランスファーした。作製したサザンプロットについてshort arm領域中の0.4 kbpのPvuII断片をプローブBとして用いたサザンハイブリダイゼーション法により解析を行った。1.2 kbpにバンドが検出されたクローンについて、引き続きスケールアップして培養した細胞からそのゲノムDNAを抽出し、EcoRI制限酵素処理を行ったものを用いて、LLPL cDNA 3'-非翻訳領域に存在するshort armの外側領域の0.5 kbpのHindIII/PstI断片をプローブCとして使用しゲノミックサザン解析を行った。LLPL遺伝子のノックアウト細胞株では6.8 kbp（Disrupted allele）および7.5 kbp（Wild-type allele）の位置にバンドが検出できた。これに対して対照である野生株では7.5 kbp（Wild-type allele）のバンドのみが検出できた。Wild allele由来の7.5 kbpとDisrupted allele由来の6.8 kbpの2本のバンドが検出できたものを最終的に目的とする相同組換え体として選択した。2回の相同組換え体取得の実験を行ったところ、G418とFIAU両方に耐性を示した計20 430クローンのうち5クローンが変異の導入されている相同組換え体であることを確認した（図3）。

参考例5 相同組換え体ES細胞LX-2-163株を用いたキメラマウスの作出

25 1. 胚盤胞の取得

胚盤胞採取用動物は下記のように作出した。まず、8週齢C57BL/6マウス（CrJ）雌マウスを購入し、室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ および7～19時の12時間日照条件に制御されたSPF動物飼育施設にて1週間馴化させた。実験初日に10週齢以上の同系統雄マウスと同居させ、自然交配を行った。

翌日、同居させた雌マウスの膣栓確認を行い、膣栓確認された雌マウスはマイクロインジェクション実験まで3日間飼育を行った。

- 5 マイクロインジェクション実験当日、マウスを頸椎脱臼により屠殺後、腹部を開腹し卵巣、卵管、子宮を取り出した。子宮角より上部を取り除き、子宮部を左右切り分けた。さらに子宮角側および膣側からそれぞれ25G注射針を差し込み、採卵用培地（10% FCS, 100U ペニシリンおよび100U ストレプトマイシンを含有するDMEM）を用いて灌流し、1匹分ずつの灌流液を3.5cmシャーレに回収し、37℃、7% CO₂条件下のインキュベーターに30分以上静置した後、胚盤胞のみを回収した。

10 2. 相同組換え体ES細胞の調製

- 5 × 10⁵あるいは1 × 10⁶の細胞密度で凍結保存されていた相同組換え体ES細胞は実験2日目に解凍後、直ちにSTO細胞をFeeder培地（10% FCS, 200mM L-glutamine, 10mM NEAA, 100U ペニシリンおよび100U ストレプトマイシンを含有するDMEM）にて培養
15 しておいた6cm径フィーダーディッシュ上に播種した。37℃、7% CO₂条件に制御されたインキュベーター中において マイクロインジェクション実験当日までES培地（16% FCS, 200mM L-glutamine, 10mM NEAA, 100U ペニシリン, 100U ストレプトマイシン, 1M HEPES, 1000U ESGROおよび0.1mM β-メルカプトエタノール
20 を含有するDMEM）中で3日培養を行った。

- 増殖した相同組換え体ES細胞は培地を除いたあとPBS溶液を用いて2回洗浄した。洗浄した細胞は0.025% トリプシン溶液による5分間処理を行い、上記ES培地を添加後、1200rpm、2分、4℃条件で遠心した。次に上清を除き、ES培地を2～3ml添加し、よく細胞をほぐしてからさらに同培地
25 を添加し、10mlに容量調整を行った。以上の細胞懸濁液を10cm径カルチャーディッシュに播いた後、37℃、7% CO₂条件に制御されたインキュベーター内で30分間培養し、フィーダー細胞をカルチャーディッシュに接着させた。さらに上清中含まれたES細胞のみを6cm径ベトリディッシュに回収し、マイクロインジェクション実験を開始するまで4℃条件下に保存した。

3. 相同組換え体ES細胞のマイクロインジェクション実験

インジェクションチャンバーとして6 cm径ペトリディッシュのふたの中央にマイクロインジェクション用培地(16% FCS, 200mM L-glutamine, 10mM NEAA, 100U ペニシリン, 100U ストレプトマイシン, 20mM HEPESおよび0.1mM β -メルカプトエタノールを含有するDMEM)の1ドロップを滴下し、ドロップ内中央に胚盤胞を5~10個、ドロップ内周辺部に上記の相同組換え体ES細胞を移した。ドロップが乾燥しないよう流動パラフィンを添加し、4℃で20~30分冷蔵した。マイクロインジェクション実験はHoganらの方法(Hogan, B., Costantini, F., and Lacy, E. (Eds). 1986. Manipulation the mouse embryo; A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.)に準拠して行った。相同組換え体ES細胞の胚盤胞へのマイクロインジェクションは、ドロップ中の10~15個のES細胞をマイクロインジェクションピペットで採取した後、胚盤胞の内部細胞塊と反対側の位置から上記マイクロインジェクションピペットを胞胚腔に差し込み、注入する方法で行った。マイクロインジェクションを終了した胚盤胞は10% FCSを添加したDMEM培地に移し、37℃、7% CO₂条件に制御されたインキュベーターにおいて胚盤胞が元の形に戻るまで培養した。正常な胚盤胞は下記の方法により作製したICR(JcL)系統偽妊娠雌マウスの左右子宮角に各8~10個移植し、室温25±1℃、湿度50±10%および7~19時の12時間日照条件に制御された飼育室にて移植マウスの飼育を行った。

偽妊娠雌マウス作出は次のように行った。8週齢ICR(JcL)系統雌を購入し、室温25±1℃、湿度50±10%および7~19時の12時間日照条件に制御されたSPF動物飼育施設にて1週間馴化させた。実験2日目、あらかじめ用意された10週齢以上のICR(JcL)系統精管結紮雄マウスと同居させ、自然交配を行った。翌日、同居させた雌マウスの膣栓確認を行い、マイクロインジェクション実験当日まで2日間飼育を行い、実験に供した。

以上の結果、LX-2-163株のマイクロインジェクション実験では仔マウスを49個体得た。そのうち27個体はアグーチ色の体毛を有するキメラマウスであった。キメラマウスの体毛色に対するES細胞の寄与率(キメラ率)には個

体間変異がみられた。同実験においては75%以上の高キメラ率を有する雄キメラマウス10個体が得られた。

参考例6 LLPL欠損マウスの作出

- 5 高キメラ率を示した雄キメラマウスのみを10週齢以上のC57BL/系統（CrJ）雌との交配を行った。最初、ES細胞の生殖系列への移行の判定は、産仔体毛色を確認する方法によって行った。LX-2-163株細胞の寄与率がほぼ100%のキメラマウスとの交配から得られた75匹の仔マウスはすべてアグーチ色を示し、産仔は全てES細胞由来と考えられた。75%以上の高キメラ率
- 10 を有する雄キメラマウスとの交配から得られた120匹の仔マウスでは、そのうち80匹がES細胞に由来するアグーチ色を示した。次にアグーチ色の体毛色を呈するマウスについて下記のPCR法およびサザン解析によって遺伝子欠損を判定した。

- ES細胞由来の子マウスの尾から定法に従ってDNAを抽出し、このゲノムDNAを鋳型としてネオマイシン耐性遺伝子上のセンス鎖プライマーSI-75（
- 15 配列番号：5）とLLPL遺伝子上のセンス鎖プライマーP4-s（配列番号：7）および、short arm上に位置するアンチセンス鎖プライマーP3-t（配列番号：6）の3種類のプライマーを用いたPCRを行い、アガロースゲルにて解析した。このプライマーを用いると、変異の導入されていないWild-type allele
- 20 からは0.4 kbpのバンドの増幅が見られ、LLPL遺伝子に変異が導入されたDisrupted alleleからは0.3 kbpのバンドの増幅が見られる。キメラマウス（F0）とC57BL/6Jから得られた産仔28例（雄12，雌16）のうち、16例（雄6，雌10）において0.3 kbpと0.4 kbpの2本のバンドの増幅が認められ、LLPL遺伝子に変異（欠損）が導入されたヘテロ接合体マウス
- 25 であると考えられた。これらのマウスDNAについてEcoRI処理した後に、実施例1と同様にプローブCを用いてゲノミックサザンハイブリダイゼーションにて解析した。参考例4で得られたLLPL遺伝子欠損ES細胞株LX-2-163と同様に7.5 kbpおよび6.8 kbpの位置にバンドが検出され、ヘテロ接合体マウス（F1）であることが確認された。

実施例1 LLPLのアポトーシス発現への関与

LLPL欠損マウスおよびその野生型マウスに由来する初代培養細胞を用い、TNF- α 、紫外線、過酸化水素などのストレス、LPS、セラミド等のアポト
5 ーシス惹起性刺激を細胞に加え、アポトーシスに特異的な細胞生物学的あるいは
生化学的マーカー（例えば、カスパーゼ活性、クロマチン凝集、染色体の断片化
等）の検出を行う。野生型マウスに比べLLPL欠損マウスでは、低刺激でこれ
らの現象が観察される。すなわち、アポトーシスの発現へのLLPL遺伝子（ま
たは遺伝子産物）の関与が示唆される。LLPL欠損マウスはアポトーシス誘導
10 を補償する薬剤のスクリーニングに使用することができる。

実施例2 酸化LDL及びDL-PPMPによるアポトーシス誘導感受性

袴田らの方法（実験医学別冊 vol. 14, No. 12, 循環研究プロトコル, pp. 4
9-52 (1996)）に従い、チオグリコレート刺激後のLLPL/Ap o Eダブルノ
15 ックアウトマウスおよびAp o Eノックアウトマウスより腹腔マクロファージを
調製した。LDLは山村らの方法（新生化学実験講座4, pp. 187-206 (1993)）
に従い、ウサギ血清より調製後、袴田らの方法（細胞工学別冊 医学実験マニ
アルシリーズ 2、動脈硬化+高脂血症研究ストラテジー, pp. 36-41 (1996)）
に従い酸化LDLを調製した。腹腔マクロファージ細胞は所定濃度のグルコシル
20 セラミド合成酵素阻害剤であるDL-threo-1-Phenyl-2-palmitoylamino-3-morphol
ino-1-propanol-HCl (DL-PPMP)を含む酸化LDL含有DMEM-25m
M HEPES (pH 7) 培地を用いて24時間培養した。PBSで2回洗浄し
、Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche社)を用いてアポトーシス細胞を染色
した。DAPI含有VECTASHIELD (VECTOR社)でマウントし、蛍光顕微鏡下でア
25 ポトーシス細胞を検出した。Image-Pro Plus Ver. 4.5 (MediaCybernetics社)に
よる画像処理により、DAPI陽性面積に対するAnnexin-V陽性面積比
を求めた。Ap o Eノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージ細胞における
コントロール処理条件の値を1として各条件での相対比を求めた。結果を表1に
示す。

LLPL/ApoE 遺伝子型	相対比	
	DL-PPMP(μ M)	
	0	5
ワイルド/ホモ	1	4
ホモ/ホモ	9	51

表1が示すように、LLPL欠損マクロファージ細胞はLLPL野生型マクロファージ細胞に比較し、酸化LDL及びDL-PPMP誘発アポトーシスの感受性が高いことが示された。

- 5 LLPL欠損に起因する、アポトーシス感受性の上昇を確認した。

実施例3 組換えヒトLLPLタンパクのヒト大動脈内皮細胞における抗アポトーシス作用

- 正常ヒト大動脈内皮細胞 (BIO WHITTAKER社) をヒト内皮細胞用培地 (EGM-2 BulletKit、BIO WHITTAKER社) で懸濁後、6ウェルプレートに 10^5 細胞/ウェルとなるように塗抹した。一晚、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で培養後、 $10 \mu\text{g/ml}$ の組換えヒトLLPLタンパクを含有するヒト内皮細胞用培地に交換後、さらに2日間培養した。PBSで2回洗浄後、 $5 \mu\text{M}$ のDL-threo-1-Phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol-HCl (DL-PPMP) を含むヒト内皮細胞用培地に交換し、48時間培養した。サブカルチャー用試薬 (ReagentPack、BIO WHITTAKER社) を用いて細胞を回収し、Caspase-3 Activity Assay Kit (Oncogene社) を用いてCaspase-3の活性化をFACS (BD社) にて解析した。データ解析はCell Quest (BD社) を用いて、全細胞数に対するCaspase-3活性化細胞数の比を求めCaspase-3活性化細胞率とした。統計解析はDunnett検定を用いた。結果を表2に示す。
- 10
- 15
- 20

組み換えヒトLLPL前処置	Caspase-3活性化細胞率		有意差検定
	MEAN	SD	
無し	50	6	-
有り	30	3	$p \leq 0.01$

表2に示すように、組換えヒトLLPLタンパク前処置群においてDL-PPMPによるCaspase-3活性化細胞率が有意に低下した。このことから、
 5 内皮細胞において組換えヒトLLPLタンパクは抗アポトーシス作用を示すことが明らかとなった。

実施例4 LLPLサンドイッチELISA法

FLAG (DYKDDDDKペプチド) 融合ヒトLLPLタンパクを谷山らの報告 [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (B.B.R.C)、第257巻、50-56頁 (1999)] に従い作製した。

得られたFLAG融合ヒトLLPLタンパクとフロインドの完全アジュバンド (FCA) を混合し、均一なエマルジョンにした後、常法 [アンチボディー・ア・ラボラトリー・マニュアル (1988)] に従いモノクローナル抗体を作製した。

15 次に、上記で得られた8種類のモノクローナル抗体について、L. C. Gruenらの報告 [ジャーナル・イムノロジカル・メソッド (J. Immuno. Methods)、第168巻、91-100頁 (1994)] を参考にして、表面プラズモン共鳴解析装置 (ピアコア社) を用いてモノクローナル抗体の評価を行なった。

その結果、FLAG融合ヒトLLPLタンパクと強い親和性が認められた3つの抗体 (m23F, m4-1Hおよびm7-1C) を選択することに成功した。

20 精製したモノクローナル抗体m7-1Cを2.5 μ g/ml 含むCoating buffer (0.1 M Carbonate buffer, pH9.6) を96ウェルマイクロプレートに200 μ lずつ分注し、4℃で24時間放置した。次に、Wash buffer A (PBS, 0.05% Tween20) で6回洗浄した後に、ウェルの余剰の結合部位をBlocking buffer (PBS, 0.05% Tween20, 1% BSA) を加え不活化した。上記調製済みプレートに、Dilu

tion buffer A (10 mM Na-phosphate, pH 7.4, 1% BSA, 1 M NaCl, 0.05% Tween 20, 1 mM SDS, 1% Mouse serum) で希釈したFLAG融合ヒトLLPLタンパク標準液を200 μ l 加え、4℃で24時間反応させた。Wash buffer Aで6回洗浄したのち、Dilution buffer B (PBS, 0.05% Tween20, 1% BSA, 1% Mouse serum) で3000倍希釈した200 μ l のHRP標識したモノクローナル抗体m4-1H-HRPを加え、4℃で24時間反応させた。Wash buffer Aで6回洗浄、Wash buffer B (10 mM Na-phosphate (pH 7.4), 0.75 M NaCl, 0.05% Tween20) で6回洗浄したのち、Quanta Blu (PIERCE社) を用いて固相上のHRP活性を測定した(酵素反応は、室温で60分)。結果を図4に示す。

10 これより、固相抗体として7-1Cを用い、標識体として4-1H-HRPを用いるサンドイッチELISA法は、ヒトLLPLを0.5 ng/mlまで検出することが可能であり、極めて高感度に検出することが可能であることがわかった。

つぎに、構築したELISA系を用いて、ヒト血清中のLLPL濃度を測定した。結果を図5に示す。

15 ヒトLLPLの血中濃度は、 8.4 ± 8.0 ng/mlと予想された。また、THP-1細胞をフォルボルミリステートアセテート(PMA)、100 nMで3日間処理し、マクロファージ様にした後、1% FBSおよび25 mM HEPESを含むRPMI 1640培地に置き換え、1から3日間培養した培養上清について、LLPL産生量を測定した。結果を図6に示す。

マクロファージ様THP-1細胞3日間のLLPL分泌産生量は、 2.3 ± 1.2 ng/mlと予想された。

25 実施例5 LLPL/ApoEダブル欠損マウスにおける酸性ホスホリパーゼA₂ (aPLA₂) 活性の測定

LLPL/ApoEダブル欠損マウスから調製した肝臓、腎臓および脳組織におけるaPLA₂活性を測定した。反応バッファー(50 mM クエン酸ナトリウム, pH4.5) にリボソーム(phosphatidylcholine (70 mol%), 1-acyl-2-[1-¹⁴C] phosphatidylethanolamine (2 mol%), dicetylphosphate (30 mol%)) を最終濃度

- が $128 \mu\text{M}$ になるように基質として加え、つぎに各組織ライセートタンパク質（最終濃度： $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を加え全量を $500 \mu\text{l}$ とした。 37°C で 1 時間インキュベートし、クロロホルム／メタノール（2／1）を加えて反応を終了させた。激しく攪拌した後に、0.9%塩化ナトリウム溶液 $300 \mu\text{l}$ を加え、さらに
- 5 激しく攪拌、遠心後、クロロホルム層を回収した。得られたクロロホルム層を乾固させた後に、 $50 \mu\text{l}$ のクロロホルム／メタノール（95／5）で再溶解し、 $20 \mu\text{l}$ を HPTLC（メルク社）にスポットした。クロロホルム／酢酸（9／1）で展開後、BAS イメージングアナライザー（富士フィルム社）を用いて遊離脂肪酸を検出した。対照として、ApoE 欠損型で LPL 野生型およびヘテロ接合型マウスの組織を用いた。その結果を図 7 に示す。

LPL 欠損マウスでは、調べた組織いずれにおいても aPLA_2 活性がほぼ完全に消失していることを確認した。

実施例 6 蛍光基質を用いた酸性ホスホリパーゼ A_2 活性の測定

- 15 実施例 5 で使用した LPL/ApoE ダブル欠損マウスの肝臓組織ライセートタンパク質について、蛍光リン脂質である 1,2-bis-(1-pyrenebutanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (B-3781, Molecular Probes 社) を用いて酸性ホスホリパーゼ A_2 活性を測定した。すなわち反応バッファー（50mM クエン酸ナトリウム, pH4.5）に蛍光リン脂質のメタノール溶液（最終濃度： $0.9 \mu\text{M}$ ）を基質
- 20 として加え、組織ライセートタンパク質（最終濃度： $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を加え全量を $200 \mu\text{l}$ とした。 37°C でインキュベートし、1 時間後に蛍光強度（excitation: 320nm, emission: 405nm）を測定した。対照として、ApoE 欠損型で LPL 野生型およびヘテロ接合型マウスの組織を用いた。その結果を図 8 に示す。
- 25 また、腹腔マクロファージから調製したライセートタンパク質（最終濃度： $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）についても同様に測定を行なった。結果を図 9 に示す。
- LPL 欠損マウスでは、調べた組織いずれにおいても、酸性ホスホリパーゼ A_2 活性がほぼ完全に消失していることを確認した。

実施例7 LLPL/ApoEダブル欠損マウスにおける1-*O*-アシルセラミドシンターゼ活性の測定

LLPL/ApoEダブル欠損マウスから調製した肝臓、腎臓および脳組織における1-*O*-アシルセラミドシンターゼ活性を測定した。

- 5 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSAを含む反応バッファー (50mM クエン酸ナトリウム, pH 4.5) にリポソーム (最終濃度: 128 μM , phosphatidylcholine (70 mol%), 1-acyl-2-[1- C^{14}]phosphatidylethanolamine (2 mol%), dicetylphosphate (30 mol%), *N*-acetyl-sphingosine (最終濃度: 20 μM) を基質として加え、つぎに各組織ライセートタンパク (最終濃度: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加え全量を50
- 10 0 μl とした。37℃で30分間インキュベートし、クロロホルム/メタノール (2/1) を加えて反応を終了させた。激しく攪拌した後に、0.9%塩化ナトリウム溶液300 μl を加え、さらに激しく攪拌、遠心後、クロロホルム層を回収した。得られたクロロホルム層を乾固させた後に、50 μl のクロロホルム/メタノール (95/5) で再溶解し、20 μl をHPTLC (メルク社) にスポットした。クロロホルム/酢酸 (9/1) で展開後、BASイメージングアナライ
- 15 ザー (富士フイルム社) を用いて反応生成物である1-*O*-acyl-*N*-acetyl-sphingosineを検出し、対応する画分をTLCプレートから切り出した後に、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。対照として、ApoE欠損型でLLPL野生型およびヘテロ接合型マウスの組織を用いた。その結果を図10に
- 20 示す。LLPL欠損マウスでは、調べた組織いずれにおいても1-*O*-アシルセラミドシンターゼ活性がほぼ完全に消失していることを確認した。

産業上の利用可能性

- 本発明のLLPLを用いるスクリーニング方法によれば、LLPL欠損に起因する各種疾病の予防および/または治療剤を効率良くスクリーニングすることができる。

また、本発明のLLPL発現不全非ヒト動物は、LLPLにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、LLPL欠損に起因する疾病のモデルとなり得る。したがって、このモデルによれば、LLPL欠損に起因する各種症状、例え

ばアポトーシスに起因する疾病の予防および／または治療剤のスクリーニングや、LLPL 関連疾患の原因究明および治療法の検討に有用である。

さらに、本発明のスクリーニング方法によって得られる化合物は、アポトーシスに起因する疾病の予防および／または治療剤として有用である。

請求の範囲

1. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、当該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のレシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ様リゾホスホリパーゼ（LLPL）活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 5 2. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩を用いる、請求項1記載のスクリーニング方法。
3. LLPL活性を変化させる化合物またはその塩がアポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩である請求項1または請求項2記載のスクリーニング方法。
- 10 4. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする、当該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のレシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ様リゾホスホリパーゼ（LLPL）活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 15 5. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩を含有してなる、請求項4記載のスクリーニング用キット。
- 20 6. 請求項1～3のいずれかに記載のスクリーニング方法または請求項4もしくは5記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のLLPL活性を変化させる化合物またはその塩。
- 25 7. 請求項6記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
8. アポトーシス誘導調節剤である請求項7記載の医薬。
9. 抗癌剤である請求項7記載の医薬。
10. 神経変性疾患予防・治療剤である請求項7記載の医薬。
11. 配列番号：2で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチドまたはその

- 一部を用いることを特徴とする、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 5 12. 配列番号：2で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチドまたはその一部を含有することを特徴とする、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 10 13. 請求項11記載のスクリーニング方法または請求項12記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の発現量を変化させる化合物またはその塩。
14. 請求項13記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
- 15 15. アポトーシス誘導調節剤である請求項14記載の医薬。
16. 抗癌剤である請求項14記載の医薬。
17. 神経変性疾患予防・治療剤である請求項14記載の医薬。
18. 哺乳動物に対して、請求項6または請求項13記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導調節方法。
- 20 19. 哺乳動物に対して、請求項6または請求項13記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌の予防および／または治療方法。
20. アポトーシス誘導調節剤を製造するための請求項6または請求項13記載の化合物またはその塩の使用。
21. 抗癌剤を製造するための請求項6または請求項13記載の化合物またはその塩の使用。
- 25 22. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、当該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のレシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ様リゾホスホリパー

ゼ（LLPL）活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

23. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩を用いる、請求項22記載のスクリーニング方法。

24. LLPL活性を変化させる化合物またはその塩がアポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩である請求項22または請求項23記載のスクリーニング方法。

25. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする、当該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のレシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ様リゾホスホリパーゼ（LLPL）活性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

26. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩を含有してなる、請求項25記載のスクリーニング用キット。

27. 請求項22～24のいずれかに記載のスクリーニング方法または請求項25もしくは26記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のLLPL活性を変化させる化合物またはその塩。

28. 請求項27記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

29. アポトーシス誘導調節剤である請求項28記載の医薬。

30. 抗癌剤である請求項28記載の医薬。

31. 神経変性疾患予防・治療剤である請求項28記載の医薬。

32. 配列番号：9で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

33. 配列番号：9で表される塩基配列を含有するポリヌクレオチドまたはその

一部を含有することを特徴とする、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

- 5 34. 請求項32記載のスクリーニング方法または請求項33記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の発現量を変化させる化合物またはその塩。

35. 請求項34記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

- 10 36. アポトーシス誘導調節剤である請求項35記載の医薬。

37. 抗癌剤である請求項35記載の医薬。

38. 神経変性疾患予防・治療剤である請求項35記載の医薬。

39. 哺乳動物に対して、請求項27または請求項34記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導調節方法。

- 15 40. 哺乳動物に対して、請求項27または請求項34記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌の予防および／または治療方法。

41. アポトーシス誘導調節剤を製造するための請求項27または請求項34記載の化合物またはその塩の使用。

- 20 42. 抗癌剤を製造するための請求項27または請求項34記載の化合物またはその塩の使用。

43. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードする遺伝子発現不全非ヒト哺乳動物もしくはその組織またはそれらに由来する細胞を用いることを特徴とする、アポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

- 25 44. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードする遺伝子発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与することを特徴とする、請求項43記載のスクリーニング方法。

45. 請求項43記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、アポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩。
46. 請求項43記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、アポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩を含有してなる医薬。
- 5 47. アポトーシス誘導調節剤である請求項46記載の医薬。
48. 抗癌剤である請求項46記載の医薬。
49. 神経変性疾患予防・治療剤である請求項46記載の医薬。
50. 哺乳動物に対して、請求項45記載のアポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導調節方法。
- 10 51. 哺乳動物に対して、請求項45記載のアポトーシス誘導調節作用を有する化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする癌の予防および／または治療方法。
52. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなるアポトーシス誘導阻害剤。
- 15 53. 哺乳動物に対して、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導阻害方法。
- 20 54. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有してなるアポトーシス誘導阻害剤。
55. 哺乳動物に対して、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導阻害方法。
- 25 56. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する

抗体を含有してなるアポトーシス誘導促進剤。

57. 抗癌剤である請求項56記載の剤。

58. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する

5 抗体を含有してなる癌の診断剤。

59. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを特徴とする癌の診断方法。

60. 配列番号：9で表されるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンス・ポリヌクレオチドを含有してなるアポトーシス誘導促進剤。

61. 抗癌剤である請求項60記載の剤。

62. 配列番号：9で表されるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンス・ポリヌクレオチドを含有してなる癌の診断剤

15 .

63. 配列番号：9で表されるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるアンチセンス・ポリヌクレオチドを用いることを特徴とする癌の診断方法。

64. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに対する siRNA を含有してなるアポトーシス誘導促進剤。

65. 抗癌剤である請求項64記載の剤。

66. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドに対する siRNA を含有してなる癌の診断剤。

67. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするポリヌク

レオチドを含有するポリヌクレオチドに対する s i R N A を用いることを特徴とする癌の診断方法。

68. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる酸性ホスホリパーゼA₂ (a P L A₂) 増強剤。

69. 哺乳動物に対して、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩の有効量を投与することを特徴とする酸性ホスホリパーゼA₂ (a P L A₂) 増強方法。

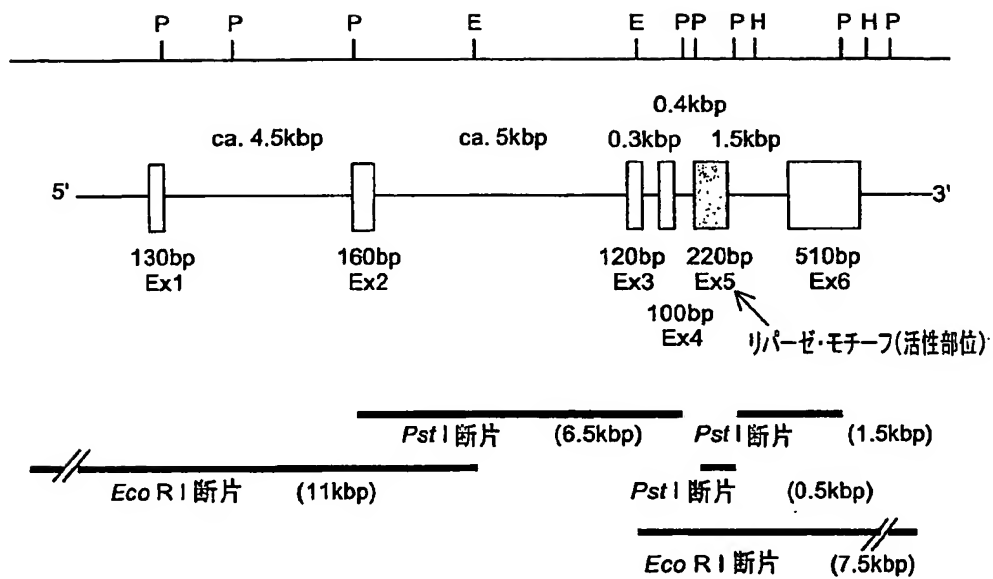
70. 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のL L P L活性または発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなるアポトーシス誘導調節剤。

71. 哺乳動物に対して、配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のL L P L活性または発現量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導調節方法。

72. アポトーシス誘導調節剤製造のための配列番号：8で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有してなるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩のL L P L活性または発現量を変化させる化合物またはその塩の使用。

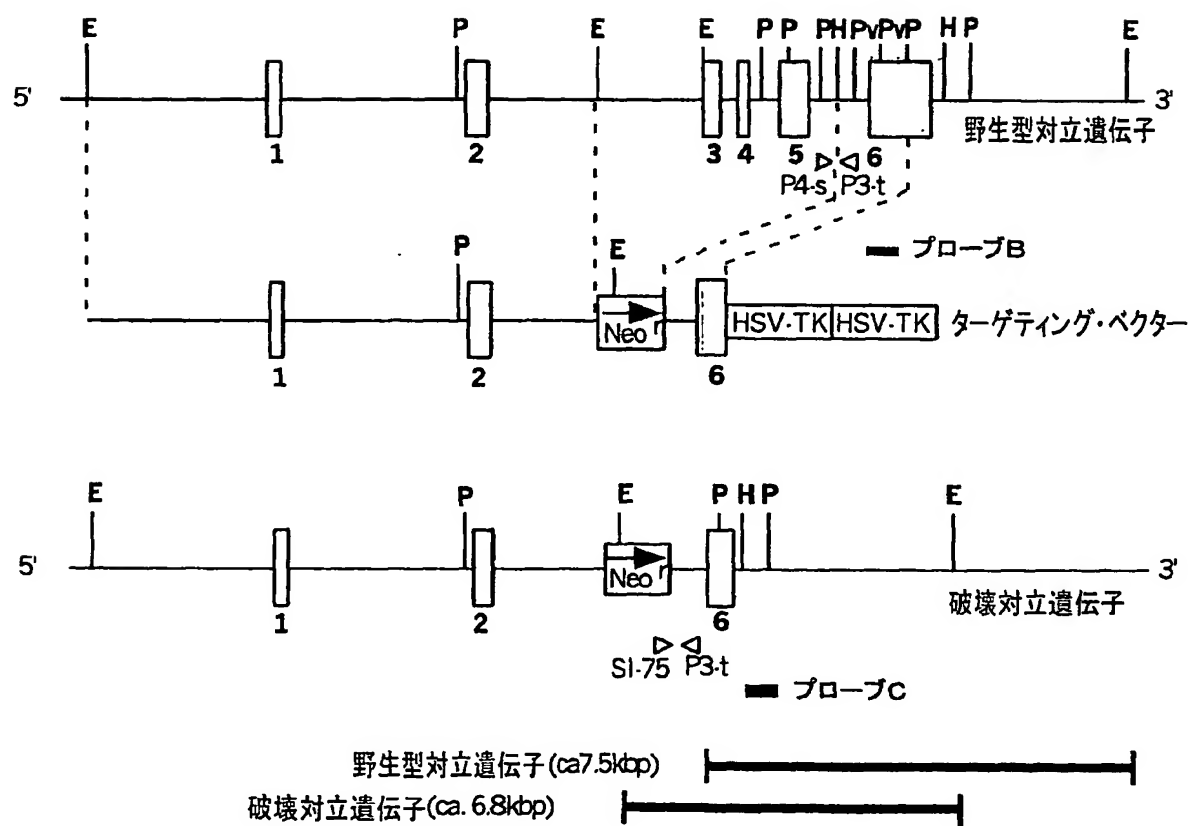
1/10

図1



2/10

図2



3/10

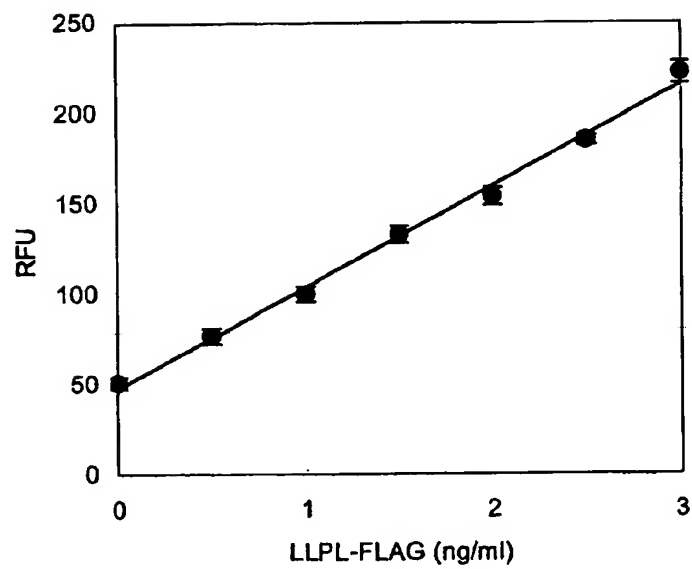
図 3



4/10

図 4

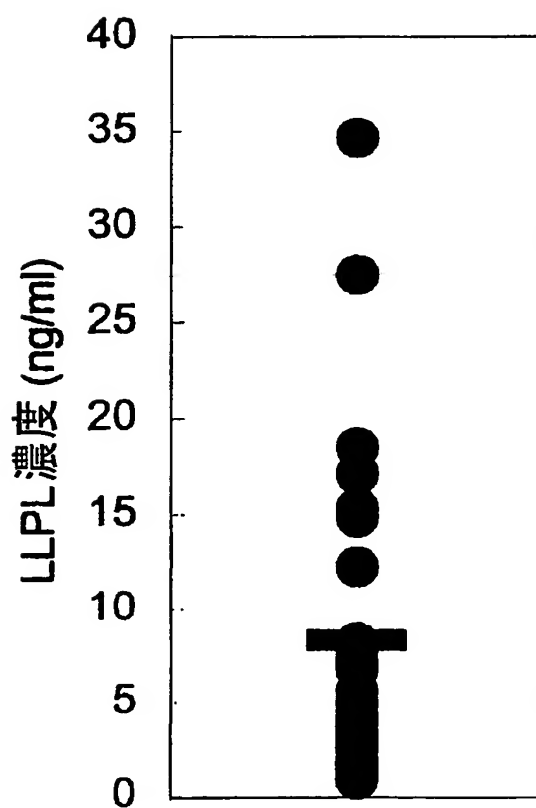
標準曲線



5 / 10

图 5

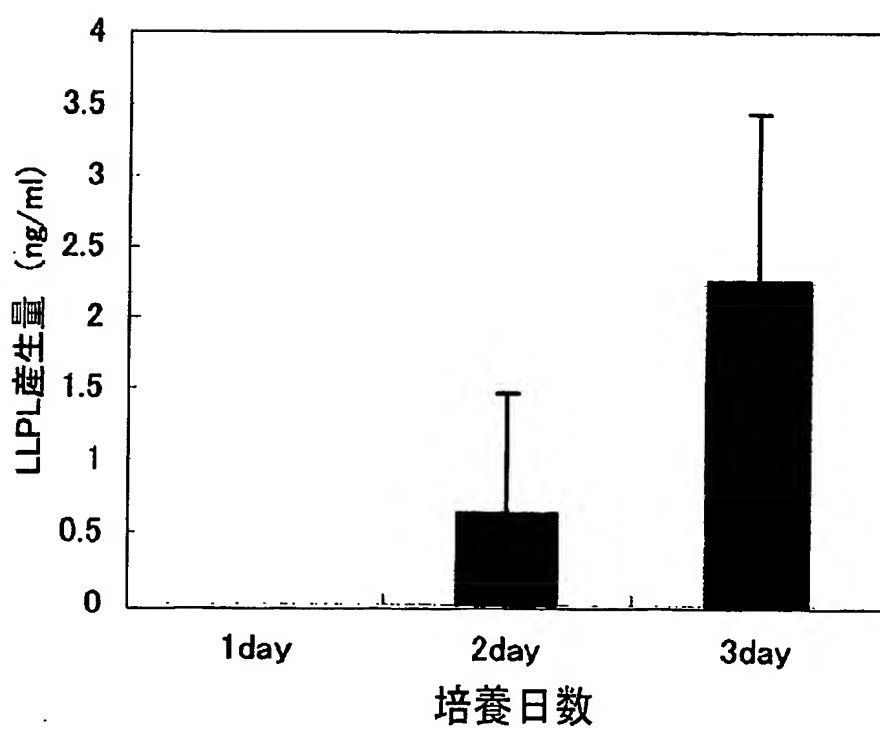
ヒトLLPL血中濃度の測定(N=29)



6/10

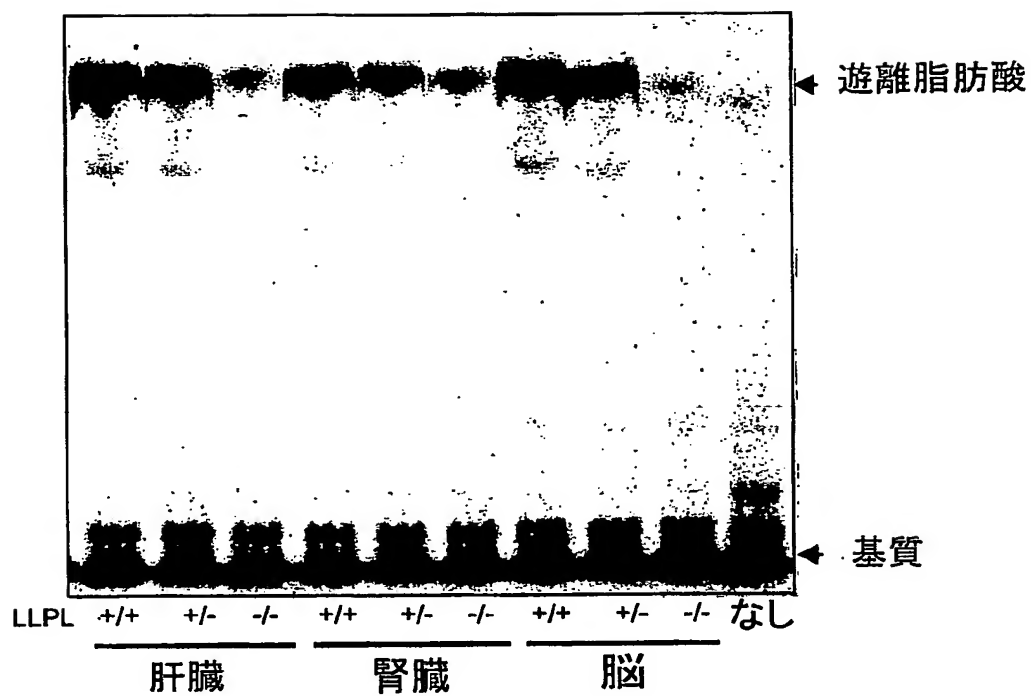
図 6

マクロファージ様THP-1細胞のLLPL産生量



7/10

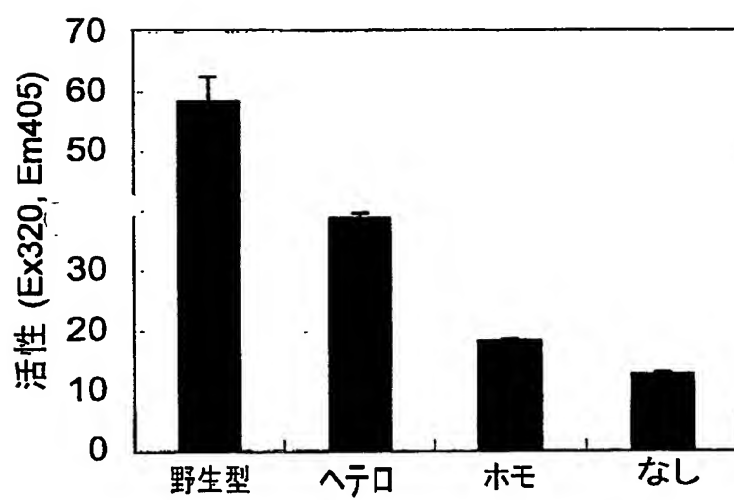
図7



8/10

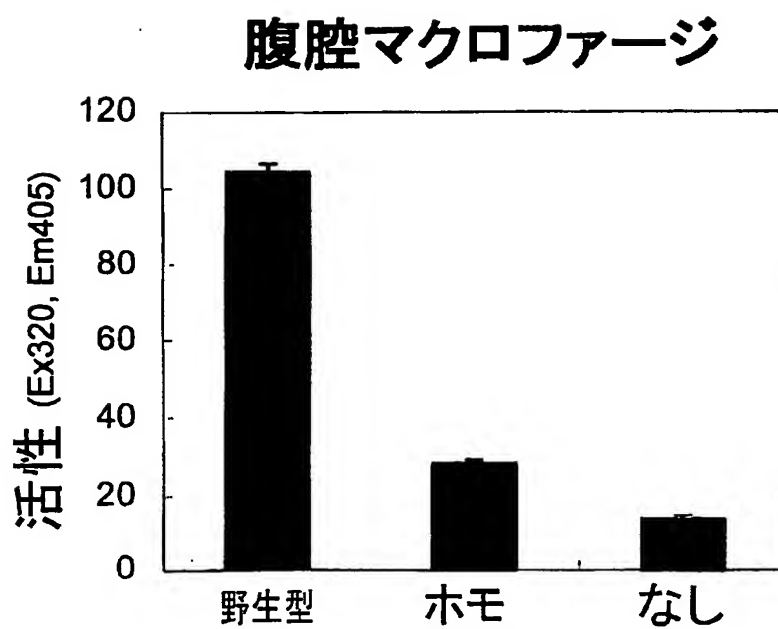
図 8

肝臓組織



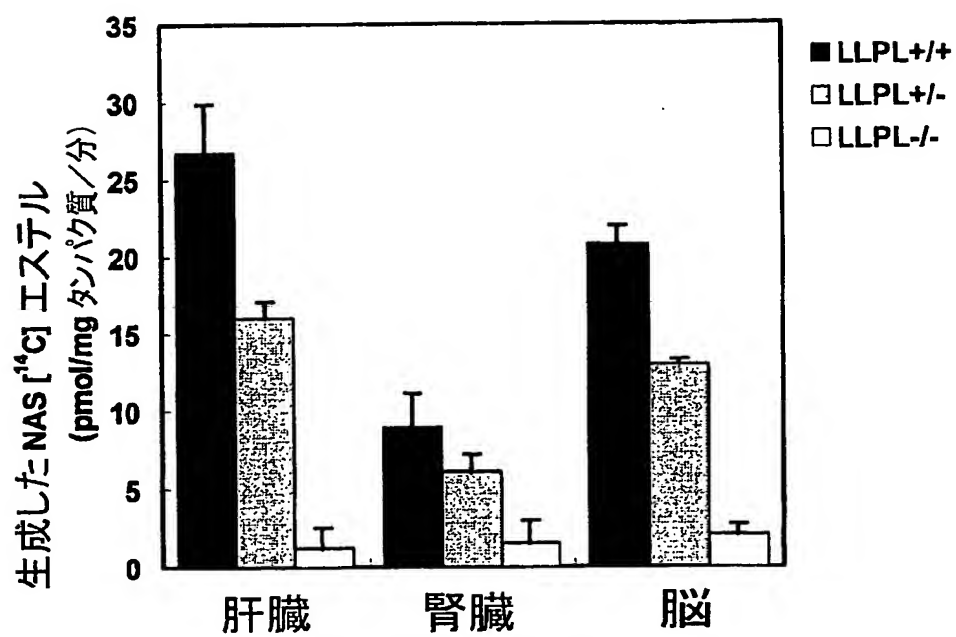
9/10

図 9



10/10

図10



1/21

Sequence Listing

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Use of LLPL gene and its product

<130> P03-0016PCT

<150> JP 2002-74180

<151> 2002-03-18

<150> JP 2002-314098

<151> 2002-10-29

<160> 15

<210> 1

<211> 412

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met	Asp	Arg	His	Leu	Cys	Thr	Cys	Arg	Glu	Thr	Gln	Leu	Arg	Ser	Gly
				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Leu	Leu	Met	Met	Leu	Ala	Asp	Leu	Thr	Leu
			20					25					30		
Pro	Ala	Gln	Arg	His	Pro	Pro	Val	Val	Leu	Val	Pro	Gly	Asp	Leu	Gly
			35				40					45			
Asn	Gln	Leu	Glu	Ala	Lys	Leu	Asp	Lys	Pro	Lys	Val	Val	His	Tyr	Leu

2/21

50	55	60
Cys Ser Lys Lys Thr Asp Ser Tyr Phe Thr Leu Trp Leu Asn Leu Glu		
65	70	75
Leu Leu Leu Pro Val Ile Ile Asp Cys Trp Ile Asp Asn Ile Arg Leu		
85	90	95
Val Tyr Asn Arg Thr Ser Arg Ala Thr Gln Phe Pro Asp Gly Val Asp		
100	105	110
Val Arg Val Pro Gly Phe Gly Glu Thr Phe Ser Met Glu Phe Leu Asp		
115	120	125
Pro Ser Lys Arg Asn Val Gly Ser Tyr Phe Tyr Thr Met Val Glu Ser		
130	135	140
Leu Val Gly Trp Gly Tyr Thr Arg Gly Glu Asp Val Arg Gly Ala Pro		
145	150	155
Tyr Asp Trp Arg Arg Ala Pro Asn Glu Asn Gly Pro Tyr Phe Leu Ala		
165	170	175
Leu Arg Glu Met Ile Glu Glu Met Tyr Gln Met Tyr Gly Gly Pro Val		
180	185	190
Val Leu Val Ala His Ser Met Gly Asn Val Tyr Met Leu Tyr Phe Leu		
195	200	205
Gln Arg Gln Pro Gln Val Trp Lys Asp Lys Tyr Ile His Ala Phe Val		
210	215	220
Ser Leu Gly Ala Pro Trp Gly Gly Val Ala Lys Thr Leu Arg Val Leu		
225	230	235
Ala Ser Gly Asp Asn Asn Arg Ile Pro Val Ile Gly Pro Leu Lys Ile		
245	250	255
Arg Glu Gln Gln Arg Ser Ala Val Ser Thr Ser Trp Leu Leu Pro Tyr		
260	265	270
Asn His Thr Trp Ser His Glu Lys Val Phe Val Tyr Thr Pro Thr Thr		
275	280	285

3/21

Asn Tyr Thr Leu Arg Asp Tyr His Arg Phe Phe Arg Asp Ile Gly Phe
 290 295 300
 Glu Asp Gly Trp Phe Met Arg Gln Asp Thr Glu Gly Leu Val Glu Ala
 305 310 315 320
 Met Thr Pro Pro Gly Val Glu Leu His Cys Leu Tyr Gly Thr Gly Val
 325 330 335
 Pro Thr Pro Asn Ser Phe Tyr Tyr Glu Ser Phe Pro Asp Arg Asp Pro
 340 345 350
 Lys Ile Cys Phe Gly Asp Gly Asp Gly Thr Val Asn Leu Glu Ser Val
 355 360 365
 Leu Gln Cys Gln Ala Trp Gln Ser Arg Gln Glu His Arg Val Ser Leu
 370 375 380
 Gln Glu Leu Pro Gly Ser Glu His Ile Glu Met Leu Ala Asn Ala Thr
 385 390 395 400
 Thr Leu Ala Tyr Leu Lys Arg Val Leu Leu Glu Pro
 405 410

<210> 2

<211> 1236

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 2

atggatcgcc atctctgcac ctgtcgcgag acccagctcc ggagtggcct cctgttacct 60
 ctgtttctac taatgatgct ggcagacctg acgctcccgg cccaacgtca cccccgggtg 120
 gtgctgggtgc ctggtgattt gggtaaccag ttggaagcaa agctggataa gccaaaggtt 180
 gtacactacc ttgtctccaa gaagacggac agctacttca cactctggct gaatctggaa 240
 ctgcttctgc ctgttatcat tgactgctgg attgacaata tcaggctggt ttacaacaga 300
 acatctcggg ccaccaggtt tcccgatggt gtggacgtgc gtgtccctgg ctttggggaa 360

4/21

```

acattttcta tggaattcct agaccccagc aagaggaatg tgggttccta tttctacact 420
atgggtggaga gccttgtggg ctggggctac acacggggtg aagacgltcg aggtgctccc 480
tatgattggc ggcgagcccc aaatgaaaac gggccctact tcttggccct gcgagagatg 540
atcgaggaga tgtaccagat gtatgggggc cccgtgggtc tggtcgcca cagcatgggc 600
aacgigtaca tgctctactt tctgcagcgg cagccacaag tctggaagga caaatatac 660
catgccitcg tctcactggg ggcgccctgg gggggcgtgg ccaagacgct gcgtgtccg 720
gcctcaggag acaacaatcg cattcccgc attgggccac tgaagatccg ggaacagcag 780
cgatctgccg tctctaccag ctggctactg ccatacaacc acacttggc acatgaaaag 840
gtatttgtat acacaccac gactaactac acgctccgg actatcaccg gttcttccg 900
gacatcggtt tcgaagatgg ctggttcag cggcaggaca cagaagggt ggttgaagcc 960
atgacgccac ccgggtgga gctgcactgc ttgtatggca ctggtgttcc cagccaaac 1020
tctttctact acgagagctt tctgatcgg gacccaaaa tctgcttcgg cgatggtgac 1080
ggcacggiga acctggagag cgtcctgcag tgccaagcct ggcagagccg ccaagagcac 1140
agagtatcat tgcaggagct gccgggaagc gagcacattg agatgctagc caatgccacc 1200
accttggctt atctgaaacg tgtgcttctg gaacct 1236

```

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer P94-1

<400> 3

ggtaaccagt tggaagcaaa g

21

<210> 4

<211> 16

5/21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer P101-4

<400> 4

ccccgggtgg cgtcat

16

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer SI-75

<400> 5

gatttggaag acaatagcag gcatgc

26

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer P3-t

<400> 6

6/21

tggtgcaagt attatcaccg cccatt 26

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer P4-s

<400> 7

cgctcatctg atcatcgtaa tgaatcg 26

<210> 8

<211> 379

<212> PRT

<213> Human

<400> 8

Ala Gly Arg His Pro Pro Val Val Leu Val Pro Gly Asp Leu Gly Asn

5

10

15

Gln Leu Glu Ala Lys Leu Asp Lys Pro Thr Val Val His Tyr Leu Cys

20

25

30

Ser Lys Lys Thr Glu Ser Tyr Phe Thr Ile Trp Leu Asn Leu Glu Leu

35

40

45

Leu Leu Pro Val Ile Ile Asp Cys Trp Ile Asp Asn Ile Arg Leu Val

50

55

60

Tyr Asn Lys Thr Ser Arg Ala Thr Gln Phe Pro Asp Gly Val Asp Val

65

70

75

80

7/21

Arg Val Pro Gly Phe Gly Lys Thr Phe Ser Leu Glu Phe Leu Asp Pro
 85 90 95
 Ser Lys Ser Ser Val Gly Ser Tyr Phe His Thr Met Val Glu Ser Leu
 100 105 110
 Val Gly Trp Gly Tyr Thr Arg Gly Glu Asp Val Arg Gly Ala Pro Tyr
 115 120 125
 Asp Trp Arg Arg Ala Pro Asn Glu Asn Gly Pro Tyr Phe Leu Ala Leu
 130 135 140
 Arg Glu Met Ile Glu Glu Met Tyr Gln Leu Tyr Gly Gly Pro Val Val
 145 150 155 160
 Leu Val Ala His Ser Met Gly Asn Met Tyr Thr Leu Tyr Phe Leu Gln
 165 170 175
 Arg Gln Pro Gln Ala Trp Lys Asp Lys Tyr Ile Arg Ala Phe Val Ser
 180 185 190
 Leu Gly Ala Pro Trp Gly Gly Val Ala Lys Thr Leu Arg Val Leu Ala
 195 200 205
 Ser Gly Asp Asn Asn Arg Ile Pro Val Ile Gly Pro Leu Lys Ile Arg
 210 215 220
 Glu Gln Gln Arg Ser Ala Val Ser Thr Ser Trp Leu Leu Pro Tyr Asn
 225 230 235 240
 Tyr Thr Trp Ser Pro Glu Lys Val Phe Val Gln Thr Pro Thr Ile Asn
 245 250 255
 Tyr Thr Leu Arg Asp Tyr Arg Lys Phe Phe Gln Asp Ile Gly Phe Glu
 260 265 270
 Asp Gly Trp Leu Met Arg Gln Asp Thr Glu Gly Leu Val Glu Ala Thr
 275 280 285
 Met Pro Pro Gly Val Gln Leu His Cys Leu Tyr Gly Thr Gly Val Pro
 290 295 300
 Thr Pro Asp Ser Phe Tyr Tyr Glu Ser Phe Pro Asp Arg Asp Pro Lys

8/21

305	310	315	320
Ile Cys Phe Gly Asp Gly Asp Gly Thr Val Asn Leu Lys Ser Ala Leu			
	325	330	335
Gln Cys Gln Ala Trp Gln Ser Arg Gln Glu His Gln Val Leu Leu Gln			
	340	345	350
Glu Leu Pro Gly Ser Glu His Ile Glu Met Leu Ala Asn Ala Thr Thr			
	355	360	365
Leu Ala Tyr Leu Lys Arg Val Leu Leu Gly Pro			
370	375		

<210> 9

<211> 1137

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

```

gccggacgic accccccagt ggtgctggic cctggigatt tgggtaacca actggaagcc    60
aagctggaca agccgacagt ggtgcactac ctctgtcca agaagaccga aagctacttc    120
acaatctggc tgaacctgga actgctgctg cctgtcatca ttgactgctg gattgacaat    180
atcaggctgg tttaacaaca aacatccagg gccaccctgt ttctgatgg tgtggatgta    240
cgtgtccctg gctttgggaa gaccttctca ctggagtcc tggacccag caaaagcagc    300
gtgggttcct atttccacac catggaggag agccttgtgg gctggggcta cacacggggt    360
gaggatgtcc gaggggctcc ctatgactgg cgccgagccc caaatgaaa cgggcctac    420
ttctggccc tccgcgagat gatcgaggag atgtaccagc tgtatggggg cccctgggtg    480
ctggttgccc acagtatggg caacatgtac acgtctact ttctgcagcg gcagccgcag    540
gcctggaagg acaagtatat ccgggccttc gttgcactgg gtgcgccctg ggggggcgtg    600
gccaagacc tgcgcgtcct ggcttcagga gacaacaacc ggatcccagt catcggggcc    660
ctgaagatcc gggagcagca ggggtcagct gtctccacca gctggctgct gccctacaac    720
tacacatggt cacctgagaa ggtgttcgtg cagacacca caatcaacta cacactgcgg    780

```

9/21

gactaccgca agttcttcca ggacatcggc tttgaagatg gctggctcat gcggcaggac 840
 acagaagggc tggtaggaagc cactatgcca cctggcgigc agctgcacig cctctatggc 900
 actggcgctc ccacaccaga ctctttctac tatgagagct tccctgaccg tgaccctaaa 960
 atctgctttg gtgacggcga tggtagtggt aacttgaaga gtgccctgca gtgccaggcc 1020
 tggcagagcc gccaggagca ccaagtgttg ctgcaggagc tggcaggcag cgagcacatc 1080
 gagatgctgg ccaacgccac caccctggcc tatctgaaac gtgtgctcct tgggccc 1137

<210> 10

<211> 411

<212> PRT

<213> Human

<400> 10

Ala Gly Arg His Pro Pro Val Val Leu Val Pro Gly Asp Leu Gly Asn
 1 5 10 15
 Gln Leu Glu Ala Lys Leu Asp Lys Pro Thr Val Val His Tyr Leu Cys
 20 25 30
 Ser Lys Lys Thr Glu Ser Tyr Phe Thr Ile Trp Leu Asn Leu Glu Leu
 35 40 45
 Leu Leu Pro Val Ile Ile Asp Cys Trp Ile Asp Asn Ile Arg Leu Glu
 50 55 60
 Cys Ser Gly Ala Ile Ser Ala His Tyr Thr Ser Ala Ser Gln Ala Gln
 65 70 75 80
 Ala Leu Leu Leu Pro Gln Thr Pro Asp Asn Trp Asp Tyr Arg Leu Val
 85 90 95
 Tyr Asn Lys Thr Ser Arg Ala Thr Gln Phe Pro Asp Gly Val Asp Val
 100 105 110
 Arg Val Pro Gly Phe Gly Lys Thr Phe Ser Leu Glu Phe Leu Asp Pro
 115 120 125
 Ser Lys Ser Ser Val Gly Ser Tyr Phe His Thr Met Val Glu Ser Leu

10/21

130	135	140	
Val Gly Trp Gly Tyr Thr Arg Gly Glu Asp Val Arg Gly Ala Pro Tyr			
145	150	155	160
Asp Trp Arg Arg Ala Pro Asn Glu Asn Gly Pro Tyr Phe Leu Ala Leu			
	165	170	175
Arg Glu Met Ile Glu Glu Met Tyr Gln Leu Tyr Gly Gly Pro Val Val			
	180	185	190
Leu Val Ala His Ser Met Gly Asn Met Tyr Thr Leu Tyr Phe Leu Gln			
	195	200	205
Arg Gln Pro Gln Ala Trp Lys Asp Lys Tyr Ile Arg Ala Phe Val Ser			
	210	215	220
Leu Gly Ala Pro Trp Gly Gly Val Ala Lys Thr Leu Arg Val Leu Ala			
225	230	235	240
Ser Gly Asp Asn Asn Arg Ile Pro Val Ile Gly Pro Leu Lys Ile Arg			
	245	250	255
Glu Gln Gln Arg Ser Ala Val Ser Thr Ser Trp Leu Leu Pro Tyr Asn			
	260	265	270
Tyr Thr Trp Ser Pro Glu Lys Val Phe Val Gln Thr Pro Thr Ile Asn			
	275	280	285
Tyr Thr Leu Arg Asp Tyr Arg Lys Phe Phe Gln Asp Ile Gly Phe Glu			
	290	295	300
Asp Gly Trp Leu Met Arg Gln Asp Thr Glu Gly Leu Val Glu Ala Thr			
305	310	315	320
Met Pro Pro Gly Val Gln Leu His Cys Leu Tyr Gly Thr Gly Val Pro			
	325	330	335
Thr Pro Asp Ser Phe Tyr Tyr Glu Ser Phe Pro Asp Arg Asp Pro Lys			
	340	345	350
Ile Cys Phe Gly Asp Gly Asp Gly Thr Val Asn Leu Lys Ser Ala Leu			
	355	360	365

11/21

Gln Cys Gln Ala Trp Gln Ser Arg Gln Glu His Gln Val Leu Leu Gln
 370 375 380
 Glu Leu Pro Gly Ser Glu His Ile Glu Met Leu Ala Asn Ala Thr Thr
 385 390 395 400
 Leu Ala Tyr Leu Lys Arg Val Leu Leu Gly Pro
 405 410

<210> 11

<211> 379

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 11

Ala Gln Arg His Pro Pro Val Val Leu Val Pro Gly Asp Leu Gly Asn
 1 5 10 15
 Gln Leu Glu Ala Lys Leu Asp Lys Pro Lys Val Val His Tyr Leu Cys
 20 25 30
 Ser Lys Lys Thr Asp Ser Tyr Phe Thr Leu Trp Leu Asn Leu Glu Leu
 35 40 45
 Leu Leu Pro Val Ile Ile Asp Cys Trp Ile Asp Asn Ile Arg Leu Val
 50 55 60
 Tyr Asn Arg Thr Ser Arg Ala Thr Gln Phe Pro Asp Gly Val Asp Val
 65 70 75 80
 Arg Val Pro Gly Phe Gly Glu Thr Phe Ser Met Glu Phe Leu Asp Pro
 85 90 95
 Ser Lys Arg Asn Val Gly Ser Tyr Phe Tyr Thr Met Val Glu Ser Leu
 100 105 110
 Val Gly Trp Gly Tyr Thr Arg Gly Glu Asp Val Arg Gly Ala Pro Tyr
 115 120 125

12/21

Asp Trp Arg Arg Ala Pro Asn Glu Asn Gly Pro Tyr Phe Leu Ala Leu
 130 135 140
 Arg Glu Met Ile Glu Glu Met Tyr Gln Met Tyr Gly Gly Pro Val Val
 145 150 155 160
 Leu Val Ala His Ser Met Gly Asn Val Tyr Met Leu Tyr Phe Leu Gln
 165 170 175
 Arg Gln Pro Gln Val Trp Lys Asp Lys Tyr Ile His Ala Phe Val Ser
 180 185 190
 Leu Gly Ala Pro Trp Gly Gly Val Ala Lys Thr Leu Arg Val Leu Ala
 195 200 205
 Ser Gly Asp Asn Asn Arg Ile Pro Val Ile Gly Pro Leu Lys Ile Arg
 210 215 220
 Glu Gln Gln Arg Ser Ala Val Ser Thr Ser Trp Leu Leu Pro Tyr Asn
 225 230 235 240
 His Thr Trp Ser His Glu Lys Val Phe Val Tyr Thr Pro Thr Thr Asn
 245 250 255
 Tyr Thr Leu Arg Asp Tyr His Arg Phe Phe Arg Asp Ile Gly Phe Glu
 260 265 270
 Asp Gly Trp Phe Met Arg Gln Asp Thr Glu Gly Leu Val Glu Ala Met
 275 280 285
 Thr Pro Pro Gly Val Glu Leu His Cys Leu Tyr Gly Thr Gly Val Pro
 290 295 300
 Thr Pro Asn Ser Phe Tyr Tyr Glu Ser Phe Pro Asp Arg Asp Pro Lys
 305 310 315 320
 Ile Cys Phe Gly Asp Gly Asp Gly Thr Val Asn Leu Glu Ser Val Leu
 325 330 335
 Gln Cys Gln Ala Trp Gln Ser Arg Gln Glu His Arg Val Ser Leu Gln
 340 345 350
 Glu Leu Pro Gly Ser Glu His Ile Glu Met Leu Ala Asn Ala Thr Thr

13/21

355 360 365
 Leu Ala Tyr Leu Lys Arg Val Leu Leu Glu Pro
 370 375

<210> 12

<211> 382

<212> PRT

<213> Human

<400> 12

Ala Leu Pro Ala Gly Arg His Pro Pro Val Val Leu Val Pro Gly Asp
 1 5 10 15
 Leu Gly Asn Gln Leu Glu Ala Lys Leu Asp Lys Pro Thr Val Val His
 20 25 30
 Tyr Leu Cys Ser Lys Lys Thr Glu Ser Tyr Phe Thr Ile Trp Leu Asn
 35 40 45
 Leu Glu Leu Leu Leu Pro Val Ile Ile Asp Cys Trp Ile Asp Asn Ile
 50 55 60
 Arg Leu Val Tyr Asn Lys Thr Ser Arg Ala Thr Gln Phe Pro Asp Gly
 65 70 75 80
 Val Asp Val Arg Val Pro Gly Phe Gly Lys Thr Phe Ser Leu Glu Phe
 85 90 95
 Leu Asp Pro Ser Lys Ser Ser Val Gly Ser Tyr Phe His Thr Met Val
 100 105 110
 Glu Ser Leu Val Gly Trp Gly Tyr Thr Arg Gly Glu Asp Val Arg Gly
 115 120 125
 Ala Pro Tyr Asp Trp Arg Arg Ala Pro Asn Glu Asn Gly Pro Tyr Phe
 130 135 140
 Leu Ala Leu Arg Glu Met Ile Glu Glu Met Tyr Gln Leu Tyr Gly Gly

14/21

145	150	155	160
Pro Val Val Leu Val Ala His Ser Met Gly Asn Met Tyr Thr Leu Tyr			
	165	170	175
Phe Leu Gln Arg Gln Pro Gln Ala Trp Lys Asp Lys Tyr Ile Arg Ala			
	180	185	190
Phe Val Ser Leu Gly Ala Pro Trp Gly Gly Val Ala Lys Thr Leu Arg			
	195	200	205
Val Leu Ala Ser Gly Asp Asn Asn Arg Ile Pro Val Ile Gly Pro Leu			
	210	215	220
Lys Ile Arg Glu Gln Gln Arg Ser Ala Val Ser Thr Ser Trp Leu Leu			
	225	230	235
Pro Tyr Asn Tyr Thr Trp Ser Pro Glu Lys Val Phe Val Gln Thr Pro			
	245	250	255
Thr Ile Asn Tyr Thr Leu Arg Asp Tyr Arg Lys Phe Phe Gln Asp Ile			
	260	265	270
Gly Phe Glu Asp Gly Trp Leu Met Arg Gln Asp Thr Glu Gly Leu Val			
	275	280	285
Glu Ala Thr Met Pro Pro Gly Val Gln Leu His Cys Leu Tyr Gly Thr			
	290	295	300
Gly Val Pro Thr Pro Asp Ser Phe Tyr Tyr Glu Ser Phe Pro Asp Arg			
	305	310	315
Asp Pro Lys Ile Cys Phe Gly Asp Gly Asp Gly Thr Val Asn Leu Lys			
	325	330	335
Ser Ala Leu Gln Cys Gln Ala Trp Gln Ser Arg Gln Glu His Gln Val			
	340	345	350
Leu Leu Gln Glu Leu Pro Gly Ser Glu His Ile Glu Met Leu Ala Asn			
	355	360	365
Ala Thr Thr Leu Ala Tyr Leu Lys Arg Val Leu Leu Gly Pro			
	370	375	380

15/21

<210> 13

<211> 414

<212> PRT

<213> Human

<400> 13

Ala	Leu	Pro	Ala	Gly	Arg	His	Pro	Pro	Val	Val	Leu	Val	Pro	Gly	Asp
1				5					10					15	
Leu	Gly	Asn	Gln	Leu	Glu	Ala	Lys	Leu	Asp	Lys	Pro	Thr	Val	Val	His
			20						25					30	
Tyr	Leu	Cys	Ser	Lys	Lys	Thr	Glu	Ser	Tyr	Phe	Thr	Ile	Trp	Leu	Asn
		35						40					45		
Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Ile	Asp	Cys	Trp	Ile	Asp	Asn	Ile
	50						55					60			
Arg	Leu	Glu	Cys	Ser	Gly	Ala	Ile	Ser	Ala	His	Tyr	Thr	Ser	Ala	Ser
65					70					75					80
Gln	Ala	Gln	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Gln	Thr	Pro	Asp	Asn	Trp	Asp	Tyr
				85						90					95
Arg	Leu	Val	Tyr	Asn	Lys	Thr	Ser	Arg	Ala	Thr	Gln	Phe	Pro	Asp	Gly
				100						105					110
Val	Asp	Val	Arg	Val	Pro	Gly	Phe	Gly	Lys	Thr	Phe	Ser	Leu	Glu	Phe
		115						120						125	
Leu	Asp	Pro	Ser	Lys	Ser	Ser	Val	Gly	Ser	Tyr	Phe	His	Thr	Met	Val
		130						135						140	
Glu	Ser	Leu	Val	Gly	Trp	Gly	Tyr	Thr	Arg	Gly	Glu	Asp	Val	Arg	Gly
145					150					155					160
Ala	Pro	Tyr	Asp	Trp	Arg	Arg	Ala	Pro	Asn	Glu	Asn	Gly	Pro	Tyr	Phe
				165						170					175

16/21

Leu Ala Leu Arg Glu Met Ile Glu Glu Met Tyr Gln Leu Tyr Gly Gly
 180 185 190
 Pro Val Val Leu Val Ala His Ser Met Gly Asn Met Tyr Thr Leu Tyr
 195 200 205
 Phe Leu Gln Arg Gln Pro Gln Ala Trp Lys Asp Lys Tyr Ile Arg Ala
 210 215 220
 Phe Val Ser Leu Gly Ala Pro Trp Gly Gly Val Ala Lys Thr Leu Arg
 225 230 235 240
 Val Leu Ala Ser Gly Asp Asn Asn Arg Ile Pro Val Ile Gly Pro Leu
 245 250 255
 Lys Ile Arg Glu Gln Gln Arg Ser Ala Val Ser Thr Ser Trp Leu Leu
 260 265 270
 Pro Tyr Asn Tyr Thr Trp Ser Pro Glu Lys Val Phe Val Gln Thr Pro
 275 280 285
 Thr Ile Asn Tyr Thr Leu Arg Asp Tyr Arg Lys Phe Phe Gln Asp Ile
 290 295 300
 Gly Phe Glu Asp Gly Trp Leu Met Arg Gln Asp Thr Glu Gly Leu Val
 305 310 315 320
 Glu Ala Thr Met Pro Pro Gly Val Gln Leu His Cys Leu Tyr Gly Thr
 325 330 335
 Gly Val Pro Thr Pro Asp Ser Phe Tyr Tyr Glu Ser Phe Pro Asp Arg
 340 345 350
 Asp Pro Lys Ile Cys Phe Gly Asp Gly Asp Gly Thr Val Asn Leu Lys
 355 360 365
 Ser Ala Leu Gln Cys Gln Ala Trp Gln Ser Arg Gln Glu His Gln Val
 370 375 380
 Leu Leu Gln Glu Leu Pro Gly Ser Glu His Ile Glu Met Leu Ala Asn
 385 390 395 400
 Ala Thr Thr Leu Ala Tyr Leu Lys Arg Val Leu Leu Gly Pro

17/21

405

410

<210> 14

<211> 412

<212> PRT

<213> Human

<400> 14

Met Gly Leu His Leu Arg Pro Tyr Arg Val Gly Leu Leu Pro Asp Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Leu Met Leu Leu Ala Asp Pro Ala Leu
 20 25 30
 Pro Ala Gly Arg His Pro Pro Val Val Leu Val Pro Gly Asp Leu Gly
 35 40 45
 Asn Gln Leu Glu Ala Lys Leu Asp Lys Pro Thr Val Val His Tyr Leu
 50 55 60
 Cys Ser Lys Lys Thr Glu Ser Tyr Phe Thr Ile Trp Leu Asn Leu Glu
 65 70 75 80
 Leu Leu Leu Pro Val Ile Ile Asp Cys Trp Ile Asp Asn Ile Arg Leu
 85 90 95
 Val Tyr Asn Lys Thr Ser Arg Ala Thr Gln Phe Pro Asp Gly Val Asp
 100 105 110
 Val Arg Val Pro Gly Phe Gly Lys Thr Phe Ser Leu Glu Phe Leu Asp
 115 120 125
 Pro Ser Lys Ser Ser Val Gly Ser Tyr Phe His Thr Met Val Glu Ser
 130 135 140
 Leu Val Gly Trp Gly Tyr Thr Arg Gly Glu Asp Val Arg Gly Ala Pro
 145 150 155 160
 Tyr Asp Trp Arg Arg Ala Pro Asn Glu Asn Gly Pro Tyr Phe Leu Ala

18/21

	165		170		175
Leu Arg Glu Met Ile Glu Glu Met Tyr Gln Leu Tyr Gly Gly Pro Val					
	180		185		190
Val Leu Val Ala His Ser Met Gly Asn Met Tyr Thr Leu Tyr Phe Leu					
	195		200		205
Gln Arg Gln Pro Gln Ala Trp Lys Asp Lys Tyr Ile Arg Ala Phe Val					
	210		215		220
Ser Leu Gly Ala Pro Trp Gly Gly Val Ala Lys Thr Leu Arg Val Leu					
225		230		235	240
Ala Ser Gly Asp Asn Asn Arg Ile Pro Val Ile Gly Pro Leu Lys Ile					
	245		250		255
Arg Glu Gln Gln Arg Ser Ala Val Ser Thr Ser Trp Leu Leu Pro Tyr					
	260		265		270
Asn Tyr Thr Trp Ser Pro Glu Lys Val Phe Val Gln Thr Pro Thr Ile					
	275		280		285
Asn Tyr Thr Leu Arg Asp Tyr Arg Lys Phe Phe Gln Asp Ile Gly Phe					
	290		295		300
Glu Asp Gly Trp Leu Met Arg Gln Asp Thr Glu Gly Leu Val Glu Ala					
305		310		315	320
Thr Met Pro Pro Gly Val Gln Leu His Cys Leu Tyr Gly Thr Gly Val					
	325		330		335
Pro Thr Pro Asp Ser Phe Tyr Tyr Glu Ser Phe Pro Asp Arg Asp Pro					
	340		345		350
Lys Ile Cys Phe Gly Asp Gly Asp Gly Thr Val Asn Leu Lys Ser Ala					
	355		360		365
Leu Gln Cys Gln Ala Trp Gln Ser Arg Gln Glu His Gln Val Leu Leu					
	370		375		380
Gln Glu Leu Pro Gly Ser Glu His Ile Glu Met Leu Ala Asn Ala Thr					
385		390		395	400

19/21

Thr Leu Ala Tyr Leu Lys Arg Val Leu Leu Gly Pro

405

410

<210> 15

<211> 444

<212> PRT

<213> Human

<400> 15

Met Gly Leu His Leu Arg Pro Tyr Arg Val Gly Leu Leu Pro Asp Gly

1

5

10

15

Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Leu Met Leu Leu Ala Asp Pro Ala Leu

20

25

30

Pro Ala Gly Arg His Pro Pro Val Val Leu Val Pro Gly Asp Leu Gly

35

40

45

Asn Gln Leu Glu Ala Lys Leu Asp Lys Pro Thr Val Val His Tyr Leu

50

55

60

Cys Ser Lys Lys Thr Glu Ser Tyr Phe Thr Ile Trp Leu Asn Leu Glu

65

70

75

80

Leu Leu Leu Pro Val Ile Ile Asp Cys Trp Ile Asp Asn Ile Arg Leu

85

90

95

Glu Cys Ser Gly Ala Ile Ser Ala His Tyr Thr Ser Ala Ser Gln Ala

100

105

110

Gln Ala Leu Leu Leu Pro Gln Thr Pro Asp Asn Trp Asp Tyr Arg Leu

115

120

125

Val Tyr Asn Lys Thr Ser Arg Ala Thr Gln Phe Pro Asp Gly Val Asp

130

135

140

Val Arg Val Pro Gly Phe Gly Lys Thr Phe Ser Leu Glu Phe Leu Asp

145

150

155

160

20/21

Pro Ser Lys Ser Ser Val Gly Ser Tyr Phe His Thr Met Val Glu Ser
 165 170 175
 Leu Val Gly Trp Gly Tyr Thr Arg Gly Glu Asp Val Arg Gly Ala Pro
 180 185 190
 Tyr Asp Trp Arg Arg Ala Pro Asn Glu Asn Gly Pro Tyr Phe Leu Ala
 195 200 205
 Leu Arg Glu Met Ile Glu Glu Met Tyr Gln Leu Tyr Gly Gly Pro Val
 210 215 220
 Val Leu Val Ala His Ser Met Gly Asn Met Tyr Thr Leu Tyr Phe Leu
 225 230 235 240
 Gln Arg Gln Pro Gln Ala Trp Lys Asp Lys Tyr Ile Arg Ala Phe Val
 245 250 255
 Ser Leu Gly Ala Pro Trp Gly Gly Val Ala Lys Thr Leu Arg Val Leu
 260 265 270
 Ala Ser Gly Asp Asn Asn Arg Ile Pro Val Ile Gly Pro Leu Lys Ile
 275 280 285
 Arg Glu Gln Gln Arg Ser Ala Val Ser Thr Ser Trp Leu Leu Pro Tyr
 290 295 300
 Asn Tyr Thr Trp Ser Pro Glu Lys Val Phe Val Gln Thr Pro Thr Ile
 305 310 315 320
 Asn Tyr Thr Leu Arg Asp Tyr Arg Lys Phe Phe Gln Asp Ile Gly Phe
 325 330 335
 Glu Asp Gly Trp Leu Met Arg Gln Asp Thr Glu Gly Leu Val Glu Ala
 340 345 350
 Thr Met Pro Pro Gly Val Gln Leu His Cys Leu Tyr Gly Thr Gly Val
 355 360 365
 Pro Thr Pro Asp Ser Phe Tyr Tyr Glu Ser Phe Pro Asp Arg Asp Pro
 370 375 380
 Lys Ile Cys Phe Gly Asp Gly Asp Gly Thr Val Asn Leu Lys Ser Ala

21/21

385					390					395					400
Leu	Gln	Cys	Gln	Ala	Trp	Gln	Ser	Arg	Gln	Glu	His	Gln	Val	Leu	Leu
				405					410					415	
Gln	Glu	Leu	Pro	Gly	Ser	Glu	His	Ile	Glu	Met	Leu	Ala	Asn	Ala	Thr
			420					425						430	
Thr	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Pro				
		435						440							